



ETUDES DE POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES T NATURELLES : iNKT17 et Th17.

Bérangère Massot

► To cite this version:

Bérangère Massot. ETUDES DE POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES T NATURELLES : iNKT17 et Th17.. Immunologie. Université Paris Descartes, 2012. Français. NNT : . tel-00738051

HAL Id: tel-00738051

<https://theses.hal.science/tel-00738051>

Submitted on 1 Oct 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Paris Descartes
12, rue de l'Ecole de Médecine
75270 Paris Cedex 06

CNRS UMR 8147
Cytokine, Hématopoïèse et Réponses Immunes
Hôpital Necker – 161, rue de Sèvres
75015 Paris

Thèse de Doctorat de l'Université Paris 5 – Paris Descartes

Ecole Doctorale B3MI

Spécialité Immunologie

Présentée par

Bérangère MASSOT

Pour l'obtention du titre de Docteur de l'Université Paris 5

ETUDES DE POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES T NATURELLES PRODUCTRICES D'IL-17 : iNKT17 et Th17

Soutenue le 27 septembre 2012, devant le jury composé de :

Professeur Lucienne CHATENOU
Docteur François TROTTEIN
Docteur Kamel BENLAGHA
Professeur Jean-Claude LECRON
Docteur Sylvain LATOUR
Docteur Maria LEITE-DE-MORAES

Présidente
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directrice de thèse

***« L'homme n'est produit que pour l'infinité,...
Il s'instruit sans cesse dans son progrès. »***

Blaise Pascal (1647 ?)

Extrait de « Fragments d'un traité du Vide »

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Docteur Michel Dy pour m'avoir accueillie au sein de son unité durant toutes ces années, pour ses contributions à nos travaux ainsi que pour ses nombreuses invitations aux Colloques des Cytokines du Croisic.

Merci infiniment au Docteur Maria Leite-de-Moraes pour m'avoir permise d'effectuer ma thèse sous sa supervision. Merci de m'avoir conseillée et dirigée tout au long de ce projet.

Je remercie sincèrement les membres du jury d'avoir accepté de faire partie de la fin de cette aventure. Merci aux rapporteurs, les Docteurs François Trottein et Kamel Benlagha, d'avoir pris le temps de corriger le manuscrit. Merci au Professeur Jean-Claude Lecron et au Docteur Sylvain Latour d'avoir accepté d'être examinateurs de la soutenance. Enfin merci au Professeur Lucienne Chatenoud d'avoir accepté la présidence de ce jury.

Merci à tous les collaborateurs d'avoir rendu ce travail possible : notamment Gérard Eberl, Shinichiro Sawa et Caspar Ohnmacht à l'Institut Pasteur de Paris, Sylvain Latour et Christelle Lenoir à l'Hôpital Necker. Merci à tous les autres co-auteurs. Merci également aux membres de la plateforme de tri cellulaire : Jérôme, Corinne et Olivier, pour m'avoir aidée.

Un énorme merci à Séverine Diem, pour tout et bien plus encore... Pour ton aide technique, ton « coaching », ton soutien inconditionnel, ton amitié ainsi que pour tous les bons moments qui n'avaient rien à voir avec la recherche. Merci...

Un grand merci également à Christelle Lenoir pour tout son travail, son soutien et sa verve sans pareille !

Merci à tous les membres « MLM team », passés : Lucia, Cristiana, Marie-Laure, merci pour toute l'amitié et les conseils, et présentes : Marine et Renata, de m'avoir supportée pendant l'écriture...

Merci infiniment aux membres de l'aquarium qui ont rendu ces années agréables : François, Rachel, Mélanie et toujours Séverine. Un grand merci à Marie pour son amitié et son soutien sans faille !

Merci à tous les membres de l'unité pour leur aide et leur présence : Sarah, Pascal, Lucie, Amédée, Pierre, Pascaline, Emilie, Raouf, Christophe, Elisa, Céline, Aurélie, Esther, Julien, Maud, Julie V, Julie B, Catherine, Fabienne, Esther, Zakia, Séverine C, Ruddy, Linh, Francine, Odile, Jean-Philippe, Flora, Olinda, Dominique, Nadia, Sophie, Anne-France, Jean-Benoît, Tereza, et à tous ceux que j'oublie... Merci à Maxime, Joël et Benjamin de « l'unité d'à côté »...

Merci à mes amis d'avoir été là. Armelle, Céline, Mélanie, Christina, Yannis et les autres.

Enfin, un grand merci à ma famille et à Johan pour leurs encouragements et leur soutien quotidien. Merci !

SOMMAIRE

ABREVIATIONS.....	8
AVANT-PROPOS.....	10
INTRODUCTION.....	12
I – Les lymphocytes iNKT.....	12
Caractérisation.....	12
Ligands des cellules iNKT.....	14
Développement des cellules iNKT.....	17
Sélection positive.....	18
Sélection négative.....	19
Développement post-phase DP.....	20
Régulation du développement des lymphocytes iNKT.....	22
Survie des thymocytes DP.....	23
Signaux du TCR.....	24
Développement des lymphocytes iNKT17 versus iNKT conventionnels.....	33
Sortie du thymus, migration en périphérie et localisation tissulaire.....	35
Activation des lymphocytes iNKT.....	36
Diversité fonctionnelles des lymphocytes iNKT.....	38
Fonctions des lymphocytes iNKT en physiopathologie.....	41
Lymphocytes iNKT et tumeur.....	41
Lymphocytes iNKT et infections.....	41
Lymphocytes iNKT et asthme allergique.....	42
Lymphocytes iNKT et auto-immunité.....	43
Lymphocytes iNKT et obésité.....	44
II – Interleukine 17 et interleukine 22.....	45
Caractérisation.....	45
Voie de signalisation et signal de transduction.....	46
Fonctions de l'interleukine 17.....	47
Maladies chroniques intestinales.....	47
Encéphalomyélite auto-immune expérimentale.....	48
Polyarthrite rhumatoïde.....	48
Association avec l'interleukine 22.....	49
Asthme allergique.....	49
Immunité intestinale.....	50
Cellules productrices d'IL-22.....	52
IL-17 : Cible thérapeutique ?.....	53

III – Lymphocytes Th17	54
Différenciation des lymphocytes Th17.....	56
Fonctions des lymphocytes Th17.....	59
Lymphocytes Th17 naturels	61
Développement	61
Propriétés fonctionnelles.....	62
OBJECTIFS	63
MATERIELS ET METHODES	64
I – Expérimentations animales	64
Animaux.....	64
Injection intraveineuse.....	64
Transfert adoptif des cellules CD4 ^{pos} CD44 ^{low}	64
Préparation des suspensions cellulaires.....	65
Isolation des lymphocytes de la lamina propria.....	65
II – Culture cellulaire	65
Activation des cellules iNKT <i>in vitro</i>	65
Activation des lymphocytes T CD4 ^{pos}	65
Différenciation des lymphocytes Th17.....	65
Stimulation des cellules.....	66
Stimulation « LPS ».....	66
III – Analyse et tri par cytométrie en flux	66
Tétramère et anticorps.....	66
Marquage extracellulaire.....	66
Marquage intracellulaire.....	67
PLZF.....	67
Enrichissement cellulaire.....	67
Tri électronique, acquisition et analyse.....	67
IV – Quantification cytokinique par ELISA	68
RESULTATS	69
I – Implication différentielle de SAP dans les voies de différenciation des lymphocytes iNKT conventionnels et des lymphocytes iNKT17	69
II – Des conditions pro-inflammatoires induisent une production rapide d'IL-17 et d'IL-22 par les cellules T CD4^{pos} CD44^{hi} RORγt^{pos} PLZF^{pos} naturelles	79
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	110
I – Rôle de SAP dans le développement des lymphocytes iNKT	110
Mécanismes impliqués dans la détermination des sous-populations de lymphocytes iNKT ?.....	112
Intensité du signal.....	112

Transduction du signal.....	113
Voie par défaut.....	115
 II – Les lymphocytes Th17 naturels produisent rapidement de l’IL-17 et de l’IL-22 en réponse à des stimuli pro-inflammatoires.....	
Lymphocytes Th17 naturels ?.....	118
Développement des lymphocytes Th17 naturels	119
Fonctions des lymphocytes Th17 naturels	121
Existence de niches fonctionnelles.....	124
BIBLIOGRAPHIE.....	126
ANNEXE.....	145
RESUME.....	155

ABRÉVIATIONS

α-GalCer = α-GC	alpha-Galactosylcéramide
AHR	« Aryl Hydrocarbon Receptor »
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
BMDCs	"Bone Marrow-derived Dendritic Cells"
CCR	"CC Chemokine Receptor"
CD	« Cluster of Differentiation »
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
DN	Double Négatif (CD4 ^{neg} CD8 ^{neg})
DAG	DiAcylGlycérol
DP	Double Positif (CD4 ^{pos} CD8 ^{pos})
EAE	« Experimental Autoimmune Encephalomyelitis »
FoxP3	« Forkhead box P3 »
G-CSF	« Granulocyte-Colony Stimulating Factor »
GalGSL	« Galacturonic Glycosphingolipid »
GF	« Germ free » = axénique
GFP	« Green Fluorescent Protein »
GM-CSF	« Granulocyte Macrophage-Stimulating Factor »
IFN	Interféron
iGb3	Isoglobotrihexosylcéramide
IL	Interleukine
iNKT	Invariant Natural Killer T
iTh17	Th17 induits
LB	Lymphocyte B
LPS	Lipopolysaccharides
LT	Lymphocyte T
LTi	"Lymphoid-tissue inducer"
MAP	"mitogen-activated protein"
NK	"Natural Killer"
NOD	"Non Obese Diabetic"
nTh17	Th17 naturels
PAMPs	"Pathogen-associated molecular patterns"
PBS	"Phosphate Buffered Saline"
PIB	PMA + Ionomycine + Bréfeldine A
PLZF	"Promyelocytic Leukemia Zinc Finger"
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
RFc	Récepteur de fragment constant
RORγt	"Retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma t"
RPM	Rotation par minute
SAP	"SLAM-Associated Protein"

SLAM	“Signaling Lymphocytes Activation Molecule”
SPF	Specific Pathogen Free = exempt de pathogène spécifique
STAT	“Signal Transducer and Activator of Transcription”
SVF	Sérum de Veau Foetal
TCR	“T Cell Receptor”
Tg	Transgénique
TGF	“Transforming Growth Factor”
Th	“T helper”
TLR	“Toll Like Receptor”
TNF	“Tumor Necrosis Factor”
Treg	T Régulateur
TT	Tétramère
WT	“Wild-Type” = sauvage
XIAP	“X-linked inhibitor-of-apoptosis”
XLP	“X-linked lymphoproliferative syndrome”

AVANT-PROPOS

Pour faire face aux multiples agressions extérieures, allant des bactéries aux toxines produites par différents organismes, le corps humain a développé un système immunitaire extrêmement efficace avec une première ligne de défense rapide, appelée immunité innée, complétée par une phase plus ciblée et tardive, appelée immunité adaptative. L'immunité innée est dite non-spécifique car réactive à divers agents étrangers, contrairement à l'immunité adaptative qui, elle, est spécifique de micro-organismes ou molécules pathogènes.

L'immunité innée fait intervenir différentes barrières physiques (la peau et les muqueuses), physiologiques (la température et le pH), cellulaires (monocytes, neutrophiles, macrophages...) et inflammatoires. L'immunité adaptative, quant à elle, est capable de reconnaître des antigènes d'un pathogène donné et de l'éliminer sélectivement. Elle est donc d'une grande diversité et permet, après reconnaissance et réponse contre ce pathogène, de créer une mémoire immunitaire qui permettra, ensuite, la mise en place plus rapide de l'immunité adaptative. Cette réponse spécifique est possible grâce à deux populations cellulaires : les lymphocytes B et les lymphocytes T.

A l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative se situent des cellules particulières répondant très rapidement aux agents pathogènes, ce sont les cellules iNKT (invariant Natural Killer T), les cellules $T\gamma\delta$, les cellules « innate-like », les LTi (Lymphoid-tissue inducer) et les lymphocytes nTh17 (Th17 naturels) récemment décrits. Toutes sont capables de produire l'interleukine (IL)-17, qui est une cytokine impliquée dans les défenses contre les pathogènes extracellulaires et fongiques, mais également dans de nombreuses maladies auto-immunes.

Notre laboratoire s'intéresse tout particulièrement aux cellules productrices d'IL-17 constituées par les cellules iNKT17, les $T\gamma\delta$, les lymphocytes Th17 conventionnels et naturels. Notre étude présentée ici portera sur le développement et les propriétés fonctionnelles des

lymphocytes iNKT17 et des lymphocytes Th17 naturels, tous deux d'importants producteurs d'IL-17.

Dans l'introduction de ce manuscrit, je présenterai tout d'abord les lymphocytes iNKT, divisés en deux sous-populations, leur développement complexe et leurs propriétés fonctionnelles diverses. Je définirai ensuite l'interleukine 17 et l'interleukine 22 ainsi que leurs rôles dans différentes maladies inflammatoires et auto-immunes. Puis je présenterai les lymphocytes Th17, leur développement et leurs fonctions, et introduirai les lymphocytes Th17 naturels.

Enfin je présenterai et discuterai les résultats obtenus au cours de ma thèse sur les lymphocytes iNKT et Th17.

INTRODUCTION

I – Les lymphocytes iNKT

Caractérisation

L'identification des lymphocytes iNKT a débuté en 1986 grâce aux travaux de plusieurs équipes. Les premiers ont identifié, à partir d'hybridome de cellules T suppressives, une population cellulaire T exprimant un TCR V α 14-J α 18 (Imai et al. 1986 ; Koseki et al. 1989). Les seconds ont identifié une population double négative, c'est-à-dire CD4^{neg} et CD8^{neg}, exprimant un TCR $\alpha\beta$ préférentiellement réarrangé avec la chaîne V β 8 (Budd et al. 1987 ; Fowlkes et al. 1987). Enfin en 1994, A. Bendelac et O. Lantz ont démontré que ces deux populations nouvellement identifiées étaient identiques et les ont nommées NKT (Lantz et Bendelac 1994), pour Natural Killer T, car ce sont des lymphocytes T exprimant un marqueur caractéristique des cellules NK, la molécule membranaire NK1.1 (CD161 chez l'Homme).

Les lymphocytes NKT ont été divisés, à l'origine, en trois sous-populations: les cellules NKT invariantes (iNKT) ou de type I, portant un TCR semi-invariant et dépendant du CD1d (voir ci-après), les cellules NKT de type II (TCR variable et CD1d-dépendant), dits NKT variants (vNKT) et les cellules NKT-like (TCR variable et CD1d-indépendant). Cette dernière population cellulaire correspond finalement à des lymphocytes T conventionnels exprimant le marqueur NK1.1 mais différents des cellules NKT ou iNKT. **(Tableau I)**

	Cellules NKT de type I (cellules iNKT)	Cellules NKT de type II
Restriction par CD1d	Oui	Non
Reconnaissance de l'α-GalCer	Oui	Non
Chaîne α du TCR	V α 14-J α 18 (souris) V α 24-J α 18 (Homme)	Diverse
Chaîne β du TCR	V β 2, V β 7 ou V β 8.2 ou 8.1 (souris) V β 11 (Homme)	Diverse
Expression de NK1.1 (CD161)	+/-	+/-

Tableau I : Classification des cellules iNKT (Adapté de Godfrey et al. 2004).

Les cellules iNKT représentent la population de NKT la mieux définie à ce jour (Taniguchi et al. 2000 et 2003 ; Bendelac et al. 2007), toutefois des études sur les souris déficientes en iNKT (J α 18^{-/-}) et les souris déficientes en iNKT et vNKT (CD1d^{-/-}) ont permis de montrer que ces deux populations cellulaires ont des rôles distincts dans différents modèles physiopathologiques murins (Godfrey et al. 2004 ; Oh et al. 2008 ; Terabe et al. 2008). Les lymphocytes iNKT sont des lymphocytes T immunorégulateurs caractérisés par un TCR constitué d'une chaîne alpha invariante (V α 14-J α 18 chez la souris et V α 24-J α 18 chez l'Homme), associée à une chaîne V β (V β 8.2 ou 8.1, V β 2 ou V β 7 chez la souris et V β 11 chez l'Homme). Ce TCR semi-invariant reflète le résultat d'une sélection positive thymique effectuée par des antigènes glycolipidiques présentés par le CD1d, molécule non polymorphique analogue des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I. Le CD1d est présent à la surface de différentes cellules comme les lymphocytes T et B, les thymocytes, les cellules dendritiques, les macrophages et les hépatocytes. Il a pour particularité de reconnaître spécifiquement des antigènes glycolipidiques comme l' α -Galactoside-Céramide (α -GalCer). Les lymphocytes iNKT sont dorénavant aisément analysables grâce à la conception et à l'utilisation d'un tétramère, associé à un fluorochrome, spécifique de ces cellules (Naidenko et al. 1999 ; Matsuda et al. 2000). Ce tétramère est un complexe de quatre molécules de CD1d et chargées avec de l' α -GalCer, ou

son analogue le PBS57, le tout associé grâce à la biotine et la streptavidine. Il constitue un outil indispensable pour la distinction entre les lymphocytes T conventionnels et les lymphocytes iNKT.

En plus de leur TCR semi-invariant, les lymphocytes iNKT sont caractérisés par l'expression de marqueurs normalement associés aux cellules Natural Killer (NK) comme NK1.1 (seulement chez la souche C57Bl/6), CD122 (IL-2R β , spécifique de l'IL-15), NKG2D, Ly49 ou encore DX5 (CD49b ou intégrine α 2) (Bendelac et al. 2007). De plus, les cellules iNKT sont considérées comme des cellules activées ou mémoires car elles portent, dans leur grande majorité, des marqueurs associés aux lymphocytes T activés, CD44^{hi} et CD69⁺. Chez la souris, les lymphocytes iNKT peuvent exprimer ou non le co-récepteur CD4, mais pas le co-récepteur CD8, ils sont donc CD4⁺ ou DN (Bendelac et al. 2007). D'autre part, les lymphocytes iNKT sont définis comme des cellules de l'immunité innée de par leurs propriétés fonctionnelles particulières. En effet, elles sont capables de reconnaître des antigènes glycolipidiques de structures différentes issus de divers organismes pathogènes ou de cellules du soi. Ensuite la réponse effectrice des cellules iNKT après activation (par le TCR ou par des cytokines inflammatoires) est extrêmement rapide (de l'ordre de l'heure, contre plusieurs jours pour les lymphocytes T conventionnels). Enfin, cette réponse effectrice est très puissante et implique la sécrétion massive de cytokines immunorégulatrices (IL-4 et IFN- γ ou IL-17 notamment) capables d'activer à leur tour les cellules dendritiques, les cellules NK ou les macrophages, d'influencer la différenciation des lymphocytes T naïfs ou encore de moduler l'activation des lymphocytes B (Bendelac et al. 2007).

Ligands des cellules iNKT

Le TCR semi-invariant des cellules iNKT est capable de reconnaître des antigènes glycolipidiques d'origine très diverse. Ainsi le premier ligand spécifique des cellules iNKT décrit a été l' α -GalCer, un glycolipide synthétique issu d'une éponge marine (Kawano et al. 1997). Ce ligand est un agoniste très puissant du CD1d et du TCR semi-invariant des cellules iNKT, et est très répandu de par ses activités immunomodulatrices et ses propriétés thérapeutiques (van Kaer. 2005). Depuis, d'autres ligands également capables d'activer les

cellules iNKT dans le contexte CD1d, ont été identifiés, notamment divers analogues synthétiques de l' α -GalCer ayant des affinités plus ou moins importantes pour le TCR des cellules iNKT, comme l'OCH (Miyamoto et al. 2001), avec un biais de réponse Th2, le β -GalCer, l' α -Glc-Cer, l' α -C-GalCer, avec un biais de réponse Th1 (Schmieg et al. 2003) ou encore le PBS-57, comparable à l' α -GalCer (Liu et al. 2006). Des lipides naturels d'origine microbienne ayant de fortes analogies structurelles avec l' α -GalCer ont également été découverts, notamment chez les bactéries de la famille de *Sphingomonas sp* comme le GalGSL (Galacturonic glycosphingolipid) et ses analogues (Kinjo et al. 2005). De plus, il a été rapporté que les cellules iNKT humaines et murines peuvent reconnaître le DAG (Diacylglycérol) issu de *Borrellia. burgdorferi*, l'agent responsable de la maladie de Lyme (Kinjo et al. 2006).

Le développement des lymphocytes iNKT étant dépendant de la présence de ligands endogènes, l'identification de ces molécules, ou tout du moins de leur nature, est devenue une priorité pour bon nombre de chercheurs. En 2004, l'identification du glycosphingolipide iGb3 (Isoglobotrihexosylcéramide), formé au niveau du lysosome, et capable d'activer les lymphocytes iNKT murins et humains, a constitué une avancée importante (Zhou et al. 2004) **(Figure 1)**. Cependant, l'étude de souris déficientes pour l'enzyme de synthèse de l'iGb3, a révélé que le développement des lymphocytes iNKT n'est pas dépendant de ce glycolipide, puisque leur phénotype est normal chez ces souris (Porubsky et al. 2007). Depuis différents lipides du soi se liant à la molécule de CD1d ont été décrits et des découvertes récentes ont montré que, chez l'Homme, les cellules iNKT peuvent être stimulées par la lysophosphatidylcholine et la lysosphingomyéline chargées sur le CD1d et présentées par les CPA (Fox et al. 2009). Par ailleurs, chez la souris, une autre étude a permis de montrer que les réponses des cellules iNKT à une bactérie dont on sait qu'elle a un antigène, comme *S. Pneumoniae*, et les réponses à des bactéries n'ayant pas d'antigène, comme *E. Coli*, ont une intensité et un besoin en IL-12 pour l'expression du CD1d similaires (Brigl et al. 2011). Ces résultats suggèrent que, même en présence de bactéries exprimant des antigènes étrangers et reconnus par les cellules iNKT, les réponses aux antigènes du soi sont prédominantes. En parallèle, l'équipe de MB. Brenner a également décrit que le lipide endogène β -D-glucopyranosylcéramide (β -GlcCer) est capable d'activer aussi bien les lymphocytes iNKT

murins que les lymphocytes iNKT humains et suggère que sa reconnaissance par le TCR pourrait transformer des signaux de danger de type inné en mécanismes d'activation des cellules iNKT (Brennan et al. 2011).

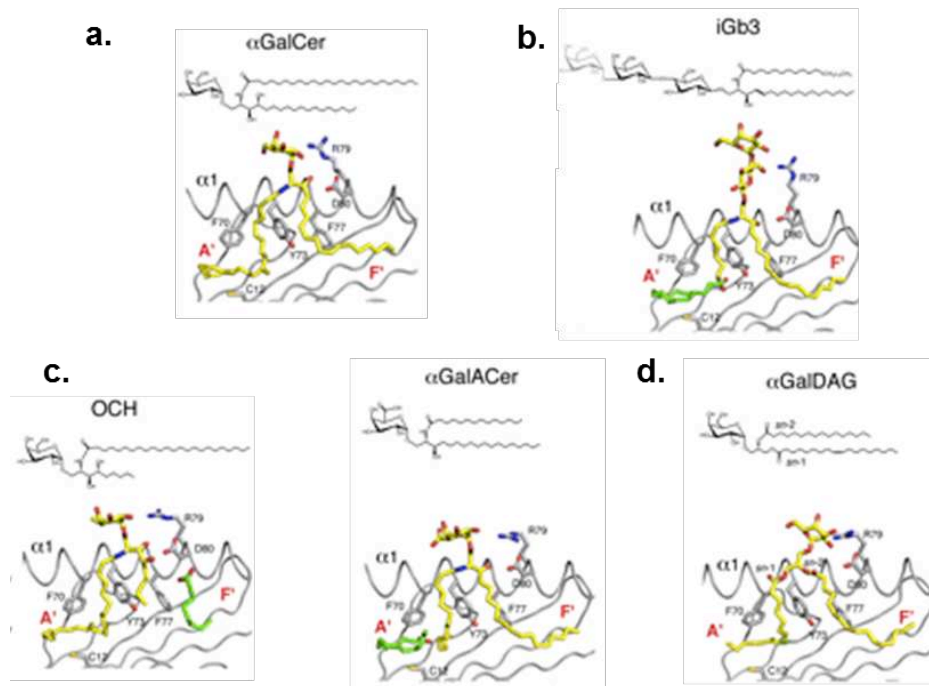


Figure 1 : Structure de quelques glycolipides reconnus par les lymphocytes iNKT.

a. Structure de l' α -GalactosylCéramide (α -GalCer), premier ligand synthétique des cellules iNKT. **b.** Structure de l'isoglobotrihexosylcéramide (iGb3), premier ligand endogène décrit. **c.** Structure de deux analogues synthétiques de l' α -GalCer, OCH et α -Gal-A-Cer. **d.** Structure d'un glycolipide microbien extrait de *Borrelia burgdorferi*, l' α -Galactosyl-Diacylglycérol (α -Gal-DAG). (Adapté de Joyce et al. 2011)

En 2007, notre laboratoire a démontré l'existence de sous-populations fonctionnelles parmi les lymphocytes iNKT dans le modèle murin, les lymphocytes iNKT conventionnels et les lymphocytes iNKT17. En effet, nous avons observé que les cellules iNKT n'exprimant ni le marqueur NK1.1, ni le marqueur CD4, sont capables de produire de grandes quantités d'IL-17, mais des taux très faibles d'IL-4 et d'IFN- γ , en réponse à l' α -GalCer (Michel et al. 2007). Par la suite, nous avons pu mettre en évidence que cette sous-population exprime spécifiquement le facteur de transcription ROR γ t, nécessaire à la production d'IL-17 et que

son développement diffère des cellules iNKT productrices d'IL-4 et d'IFN- γ dès le stade précoce double positif CD4⁺ CD8⁺ (DP) (Michel et al. 2008). Cependant, chez l'Homme, L. Moreira-Teixeira a décrit que les lymphocytes iNKT CD161⁺ (homologue du NK1.1 chez la souris), indépendamment du marqueur CD4, stimulés dans un environnement riche en TGF- β , IL-1 β et IL-23, se différencient en cellules productrices d'IL-17 (Moreira-Teixeira et al. 2011), également capables de produire de l'IL-22 sous l'influence du récepteur AHR.

Tout récemment, l'équipe de Dr. Godfrey a mis en évidence, à partir des souris J α 18-/- déficientes en lymphocytes iNKT de type I, une autre population de cellules T réactive au tétramère CD1d- α -GalCer (Uldrich et al. 2011). Cette population exprime également un TCR semi-invariant, cependant il est composé des chaînes V α 10 et J α 50 majoritairement recombinées avec les chaînes V β 8, et répondant préférentiellement à l' α -Glc-Cer (α -Glucosylcéramide) et aux antigènes glycolipidiques contenant de l'acide α -glucuronique issus de bactéries. Fonctionnellement, cette population possède les mêmes caractéristiques que les lymphocytes iNKT de type I, c'est-à-dire qu'elle est capable de produire à la fois de l'IL-4 et de l'IFN- γ , de l'IL-13 et de l'IL-17.

Développement des cellules iNKT

Après avoir envisagé un modèle dit « pré-engagé » (Sato, Nakayama et al. 1999), dans lequel le développement des lymphocytes T et des cellules iNKT diverge très précocement, il est maintenant admis et confirmé que le développement des cellules iNKT suit un modèle dit « instructif », dans lequel il existe un précurseur commun aux lymphocytes T conventionnels et aux cellules iNKT (Gapin, Matsuda et al. 2001; Benlagha, Wei et al. 2005) (**Figure 2**). Le modèle pré-engagé impliquait une différenciation des cellules NKT à partir de précurseurs exprimant déjà le marqueur NK1.1, et avant le réarrangement du TCR. Toutefois, d'autres études ont permis de mettre en évidence un précurseur commun aux lymphocytes T conventionnels et aux lymphocytes iNKT, il s'agit du modèle instructif. Ce précurseur subirait un réarrangement aléatoire du TCR $\alpha\beta$ et les cellules ayant réarrangé un TCR V α 14-J α 18, et ainsi sensibles au CD1d, seraient « instruites » par leur interaction avec le CD1d et se différencieraient alors en lymphocytes iNKT (Gapin et al. 2001).

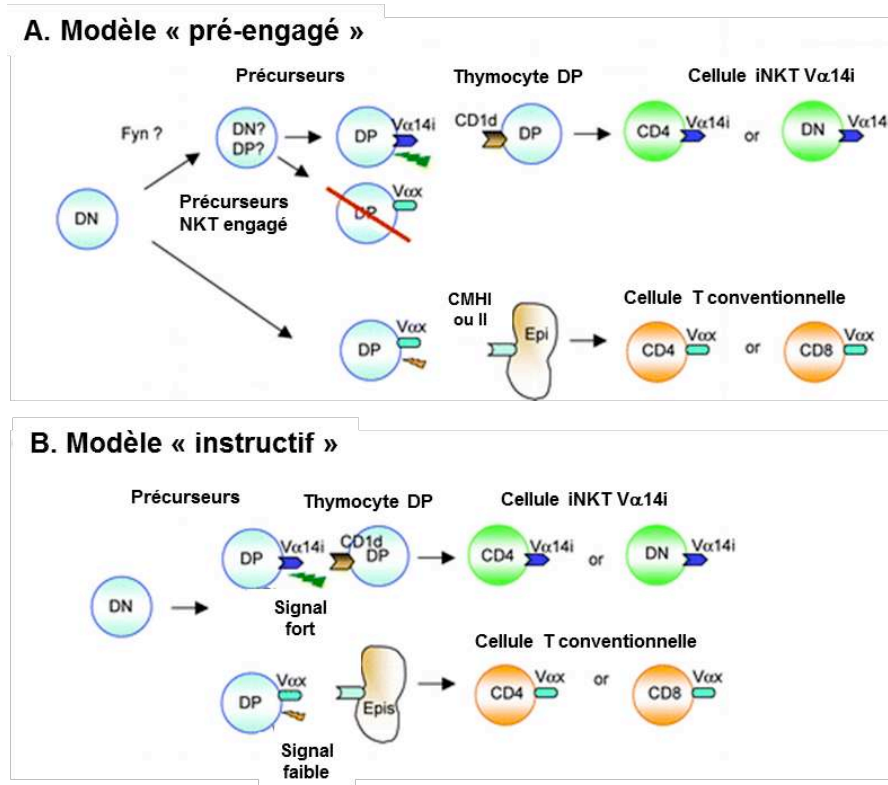


Figure 2 : Représentation des modèles de développement des lymphocytes iNKT.

A. Dans le modèle pré-engagé, une cellule précurseure « déciderait » de devenir une cellule iNKT avant même le réarrangement du TCR. **B.** Dans le modèle instructif, l'expression du TCR Vα14 par le thymocyte induit sa différenciation en cellule iNKT. (Adapté de Kronenberg et al. 2005)

Sélection positive

Les lymphocytes iNKT sont une population de cellules T thymo-dépendantes, mais ils montrent des caractéristiques développementales et fonctionnelles différentes de celles des lymphocytes T conventionnels CD4⁺ ou CD8⁺. La principale différence est que la sélection positive des cellules iNKT fait intervenir une interaction entre leur TCR et une molécule non classique de CMH I, la molécule de CD1d présentant uniquement des antigènes glycolipidiques. Ainsi les souris déficientes en molécule de CD1d sont également déficientes en lymphocytes iNKT puisque leur sélection ne peut avoir lieu. La deuxième différence réside dans la catégorie de cellules qui va permettre la sélection positive des cellules T. En effet, les

lymphocytes iNKT sont sélectionnés au niveau du cortex thymique par des thymocytes DP, c'est-à-dire CD4^{pos} et CD8^{pos}, présentant un CD1d chargé d'un glycolipide antigénique du soi, et non par des cellules épithéliales thymiques comme c'est le cas pour les lymphocytes T conventionnels (Bendelac et al. 1995 ; Coles et al. 2000). Le ligand endogène iGb3 a été proposé comme étant responsable de cette étape de sélection mais une étude a montré que des souris déficientes pour l'enzyme responsable de la synthèse de l'iGb3, et donc déficientes en iGb3, montraient des taux normaux de cellules iNKT (Porubsky et al. 2007). De plus, l'iGb3 ne semble pas être exprimé chez l'Homme (Christiansen et al. 2008), car aucune expression de l'enzyme responsable de la synthèse d'iGb3 n'a pu être détectée.

Par ailleurs, les réarrangements du TCR des lymphocytes iNKT montre un biais en faveur des chaînes V β 8, V β 7 et V β 2. En effet, près de 80% de ces cellules, dans le modèle murin, ont un TCR V α 14-J α 18/V β 8, V β 7 ou V β 2 suggérant l'existence d'un éventuel mécanisme de sélection, favorisant la sélection positive ou encore la survie des lymphocytes iNKT ayant réarrangé une de ces trois combinaisons de TCR plutôt que les rares lymphocytes iNKT ayant réarrangé un TCR différent (V α 3.2-J α 9/V β 8 par exemple) (Bendelac et al. 2007).

Sélection négative

Classiquement, durant leur développement intra-thymique, les lymphocytes T subissent une sélection positive puis une sélection négative. Cette étape correspond à une délétion des lymphocytes T réagissant trop fortement avec le CMH du soi ou avec le CMH du soi associé à un peptide du soi, soit une délétion des lymphocytes T auto-réactifs. Cependant les cellules iNKT sont, par définition, des cellules auto-réactives sensibles aux antigènes endogènes présentés par le CD1d dans le thymus. Le terme de sélection négative est donc ici plus difficile à concevoir. Toutefois, deux études supportent cette idée de sélection négative. En effet, l'administration d' α GalCer *in vivo* et *in vitro* inhibe de façon dose dépendante le développement des lymphocytes iNKT (Chun et al. 2003; Pellicci et al. 2003). Par ailleurs, la surexpression de CD1d chez des souris transgéniques entraîne une réduction du nombre de cellules iNKT périphériques ainsi qu'un biais dans le répertoire V β et une sensibilité réduite à l'antigène (Chun et al. 2003). Les lymphocytes iNKT semblent donc subir, lors de leur

développement, une sélection négative lorsqu'elles sont engagées avec des antigènes de forte avidité ou lorsque les antigènes du soi sont surreprésentés. Plus récemment, l'équipe de Baxter a développé d'autres arguments impliquant les récepteurs SLAM, engagés lors d'une reconnaissance TCR/CD1d, et en faveur de l'existence d'une sélection négative chez les lymphocytes iNKT. A partir de la souche non obèse diabétique (NOD), déficientes numériquement et fonctionnellement en lymphocytes iNKT, ils ont créé des souris transgéniques pour les récepteurs SLAM, dont l'expression par les thymocytes DP est multipliée par 2 ou par 7 selon la construction. De manière très intéressante, les souris exprimant 2 fois plus de récepteurs SLAM ont montré un doublement du nombre de cellules iNKT, confirmant le rôle des récepteurs SLAM dans la sélection positive des lymphocytes iNKT. A l'inverse, les souris exprimant 7 fois plus de récepteurs SLAM n'ont montré aucune augmentation du nombre de cellules iNKT, suggérant un contrôle strict du nombre de lymphocytes iNKT, impliquant ainsi des mécanismes de sélection négative (Jordan et al. 2011).

Développement post-phase DP

Après le réarrangement du TCR semi-invariant, les lymphocytes iNKT subissent un processus de maturation comprenant 4 étapes, des stades 0 à 3 (**Figure 3**). Au stade 0, les lymphocytes iNKT nouvellement sélectionnés, vont perdre l'expression du CD8, ce qui est valable uniquement chez la souris, puisque les cellules iNKT humaines peuvent être CD8^{pos}. A l'inverse, les cellules précurseurs acquièrent progressivement des marqueurs d'activation et/ou de maturation CD44 et CD69 (Benlagha et al. 2005), les cellules sont activées mais ne prolifèrent pas encore. Le passage au stade 1 est caractérisé par la perte du marqueur CD24 (HSA) et par l'entrée des cellules dans le cycle de multiplication cellulaire (Benlagha et al. 2002 ; Pellicci et al. 2002). A ce stade, les lymphocytes iNKT sont déjà capables de répondre à un stimulus spécifique, comme l' α GalCer, et peuvent produire rapidement des quantités importantes d'IL-4, mais pas d'IFN- γ .

Les lymphocytes iNKT évoluent rapidement vers le stade 2 durant lequel les lymphocytes iNKT sont CD44^{high} et NK1.1^{neg}, certains vont alors perdre l'expression du marqueur CD4 (Pellicci et al. 2002). L'expression différentielle de facteurs de transcription leur permet de produire à la fois de l'IL-4 et de l'IFN- γ en faible quantité, ou de l'IL-17. La sous-population de cellules iNKT productrices d'IL-17 arrête son développement au stade 2, en effet ces cellules n'acquièrent pas le marqueur des cellules NK, le NK1.1, mais leur maturation est complète à ce stade car les cultures *in vitro* montrent qu'elles sont incapables d'acquérir ce marqueur mais qu'elles sont fonctionnelles car capables de produire de l'IL-17 (Michel et al. 2008).

Au stade terminal de maturation (stade 3), les cellules iNKT acquièrent l'expression du NK1.1, mais aussi d'autres marqueurs des cellules NK, comme Ly49 ou NKG2A (Benlagha et al. 2002 ; Pellicci et al. 2002). Elles sont alors capables de produire massivement de l'IFN- γ , dont l'ARN messager est spontanément transcrit. A ce stade, les cellules iNKT matures expriment de nombreux récepteurs membranaires, dont des récepteurs de chimiokines comme CXCR3, CXCR6 et CCR5, ainsi que la chaîne β du récepteur de l'IL-15 et de l'IL-2 (CD122). L'expression de ce récepteur est indispensable pour la survie prolongée des lymphocytes iNKT, sensibles à l'action de l'IL-15. En parallèle de l'expression de ces différents récepteurs, les gènes codant pour la perforine, le granzyme B, ainsi que des ligands de récepteurs de mort comme Fas Ligand et CD95L, conférant aux lymphocytes iNKT matures des propriétés cytotoxiques.

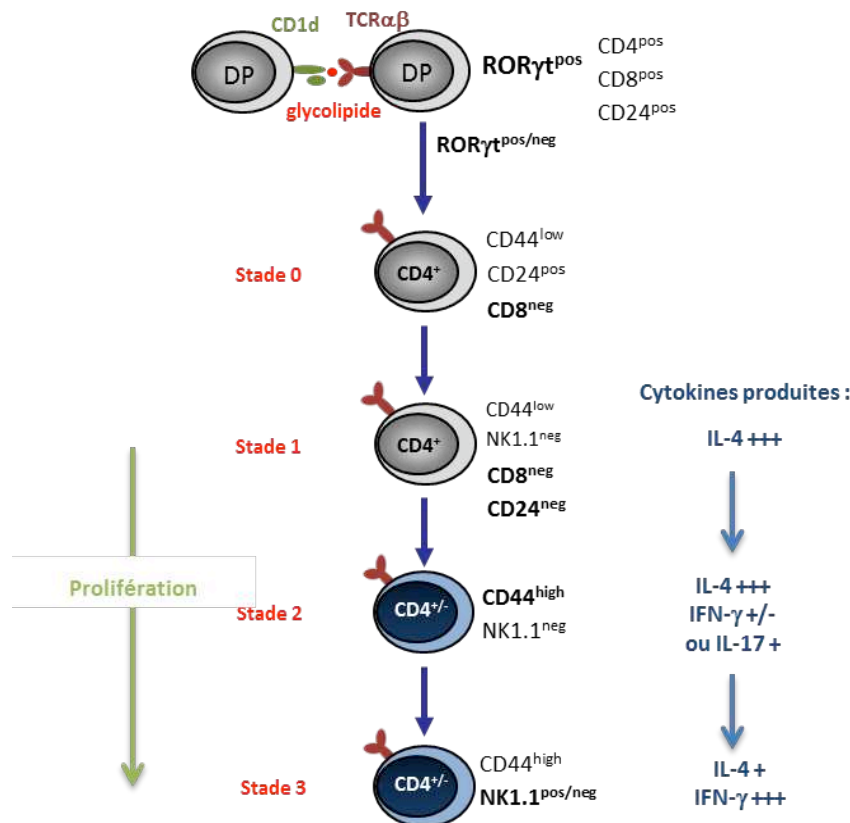


Figure 3 : Représentation simplifiée du développement thymique des lymphocytes iNKT.

Après la mise en place du TCR semi-invariant reconnaissant un lipide endogène présenté à la surface de thymocytes DP par le CD1d, les cellules précurseurs iNKT sont sélectionnées, acquièrent le CD4 mais perdent l'expression du CD24 et du CD8. Elles produisent alors massivement de l'IL-4. Elles acquièrent progressivement le marqueur CD44, peuvent produire de l'IL-4 et de l'IFN-γ ou de l'IL-17. Enfin, les lymphocytes iNKT peuvent acquérir ou non le marqueur NK1.1 et produire massivement de l'IFN-γ.

Régulation du développement des lymphocytes iNKT

Les différentes étapes de développement intra-thymique décrites ci-dessus sont très finement régulées par de nombreux facteurs, incluant divers facteurs de transcription, des cytokines ou encore des molécules pro- ou anti-apoptotiques. Ces systèmes de régulation interviennent essentiellement au moment de la sélection positive et au cours de la différenciation terminale, pour l'acquisition complète et l'homéostasie des propriétés fonctionnelles des lymphocytes iNKT.

Survie des thymocytes DP

Le tout premier point de contrôle du développement des lymphocytes iNKT consiste en la survie des thymocytes DP, qui doit être suffisamment longue pour permettre tous les réarrangements nécessaires du TCR V α 14-J α 18. Ainsi l'un des premiers facteurs influençant le développement de ces cellules est le facteur de transcription « retinoic acid-related orphan receptor » (ROR) γ t. En effet, il a été décrit, en 2005, que ce facteur prolonge la survie des thymocytes DP, car il permet une régulation positive de la transcription et de l'expression de Bcl-xL, une molécule anti-apoptotique de la famille de Bcl-2 (Egawa et al. 2005) (**Figure 6**).

En parallèle du facteur de transcription ROR γ t, c-Myb, une molécule activatrice transcriptionnelle, joue un rôle central dans l'entrée des thymocytes DP dans le lignage iNKT notamment par le contrôle du réarrangement de la chaîne α du TCR. En effet, il contrôle la demi-vie des cellules DP et l'expression de SLAMf1, SLAMf6 et SAP (Hu et al. 2010), récepteurs impliqués dans la sélection positive des lymphocytes iNKT. C-Myb est donc un facteur central du développement des cellules iNKT. Il agit par régulation positive, sur le TCR, le CD1d et l'expression de SAP, trois molécules indispensables à la génération de ces cellules. De manière intéressante la déficience en c-Myb entraîne une altération de l'expression de Bcl-xL, mais ne semble jouer aucun rôle sur le facteur de transcription ROR γ t, lui-même régulateur de Bcl-xL. Cela suggère que l'expression de la molécule Bcl-xL est indépendamment contrôlée par c-Myb et par ROR γ t (**Figure 6**).

En aval de l'expression de ROR γ t, l'expression du facteur Runx1 semble jouer un rôle important dans le développement précoce des cellules iNKT puisque l'invalidation de ce gène entraîne une profonde réduction du nombre de cellules iNKT dans le thymus (Egawa et al. 2005). Toutefois le réarrangement canonique des fragments V α 14 et J α 18 ne semble pas être affecté par l'absence de ce facteur, et les mécanismes par lesquels Runx1 influencent le développement des cellules iNKT restent encore inconnus.

Signaux du TCR

En 2005, les équipes de S. Latour et PL. Stein ont découvert que le syndrome lymphoprolifératif lié à l'X (XLP) associé à une déficience ou une mutation de la protéine adaptatrice SAP, est corrélé avec une déficience totale en lymphocytes iNKT, aussi bien chez l'Homme que chez la souris (Pasquier et al. 2005 ; Nichols et al. 2005). De manière intéressante, les patients atteints de XLP ont un défaut de réponse immunitaire contre l'infection par EBV (Epstein-Barr Virus), virus de la famille des Herpès, responsable de la mononucléose infectieuse notamment, ce qui suggère un rôle primordial des lymphocytes iNKT dans la réponse anti-virale contre l'EBV (Gaspar et al. 2002).

Le réarrangement du TCR semi-invariant implique un premier contact avec un antigène et une première « activation » des cellules iNKT. Cette étape inclut également une signalisation par la voie des molécules SLAM (pour « signalling lymphocytic activation molecule ») et des protéines adaptatrices de la famille SAP (pour « SLAM-associated Protein »), comprenant SAP, EAT-2 et ERT (**Figure 4**). Les molécules SAP sont composées de seulement un domaine SH2 (Src homology 2) et d'une courte queue C-terminale, et sont exprimées par les lymphocytes T et iNKT, les cellules NK, certains lymphocytes B pour SAP, par les cellules NK, les cellules dendritiques et les macrophages pour EAT-2 et seulement par les cellules NK pour ERT. Cette voie de signalisation correspond au tout premier point de contrôle du développement des lymphocytes iNKT. La famille des molécules SLAM est composée de six protéines distinctes, incluant SLAM, CD229, (Ly9 chez l'Homme), CD244 (2B4), CD84, Ly108 (NTB-A) et CRACC (« CD2-like receptor activating cytotoxic cells »). Ces récepteurs sont exprimés à la surface d'une grande variété de cellules hématopoïétiques, et ont diverses fonctions, incluant des rôles de régulateurs de co-stimulation, de production de cytokine par les cellules T, ou le développement des lymphocytes T innés (SLAM, correspondant à SLAMf1, et Ly108, aussi appelée SLAMf6) (Veillette et al. 2007). Les seuls membres de cette famille semblant jouer un rôle dans le développement des lymphocytes iNKT sont SLAM et Ly108 (Griewank et al. 2007). En effet, ce sont les deux molécules SLAM majoritairement représentées chez les thymocytes DP. De plus, chez les souris NOD, ayant la particularité d'avoir une déficience numérique et fonctionnelle en lymphocytes iNKT, il a été démontré que le locus génétique *slamf1* est un des loci contrôlant le nombre de cellules iNKT (Jordan

et al. 2007 ; Baxter et al. 1997 ; Hammond et al. 1998), suggérant que la déficience en cellules iNKT serait due à une faible représentation de SLAM sur ce fond génétique. De manière intéressante, les fonctions de SLAMf1 et SLAMf6 sont redondantes, car les souris déficientes pour l'une ou l'autre de ces protéines montrent un phénotype partiel, mais la combinaison des deux déficiences induit une diminution nette du nombre de lymphocytes iNKT (Griewank et al. 2007). L'explication de la nécessité de sélection des cellules iNKT par les thymocytes DP réside dans le fait que les cellules épithéliales, les macrophages et monocytes n'expriment aucun récepteur de la famille SLAM. Ainsi les thymocytes DP, grâce à la co-expression des récepteurs SLAM et CD1d, sont les cellules spécialisées et exclusives pour la sélection et la survie de la lignée des cellules iNKT.

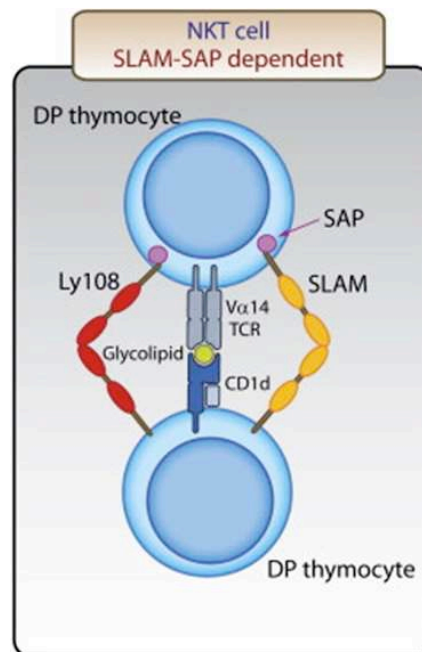


Figure 4 : Implication des récepteurs SLAM dans le développement des lymphocytes iNKT.

La différenciation des thymocytes DP en iNKT est médiée par des interactions le TCR semi-invariant Vα14 et les glycolipides présentés par la molécule de CD1d à la surface d'autres thymocytes DP. Les thymocytes DP expriment fortement les molécules SLAM et Ly108, qui sont engagées dans les associations inter-thymocytes DP et sont les médiatrices des signaux dépendants de SAP promouvant la différenciation des cellules iNKT. (Figure extraite de Veillette et al. 2007)

Il est à présent bien établi que l'engagement des protéines SLAM permet le recrutement des protéines SAP et de Fyn, kinase de la famille Src, toutes les deux essentielles pour la sélection du lignage cellulaire iNKT. En effet, les souris déficientes pour Fyn montrent une réduction sévère du nombre de lymphocytes NKT dépendant du CD1d, alors que la déficience en une autre protéine de la famille Src, la protéine Lck, entraîne une diminution du nombre de lymphocytes T et iNKT, démontrant la sélectivité de Fyn pour les cellules iNKT (Eberl et al. 1999 ; Gadue et al. 1999) (**Figure 5**). Les récepteurs SLAM sont couplés à la protéine SAP, dont il est décrit qu'elle permet le recrutement et l'activation de Fyn par liaison entre le domaine SH2, centré sur un acide aminé arginine en position 78, de SAP et le domaine SH3 de Fyn (Latour et al. 2001 ; Latour et al. 2003 ; Simarro et al. 2004). La transduction du signal via la molécule Fyn entraîne deux cascades de signalisation. La première permet la phosphorylation de la protéine kinase PKC- θ et l'activation de Bcl 10, ce qui va activer la voie de signalisation NF- κ B, ayant un rôle déterminant dans l'augmentation des mécanismes de survie des lymphocytes iNKT (Siwakumar et al. 2003 ; Stanic et al. 2004 ; Schmidt-Supprian et al. 2004). Dans la deuxième voie, Fyn phosphoryle les protéines SHIP (SH2 domain-containing inositol phosphatase), Dok 1 et 2 et RasGAP (Ras GTPase-activating protein), conduisant à l'inhibition de la voie Ras/MAPkinase. Cette voie régule la signalisation du TCR et diminue la production d'IFN- γ .

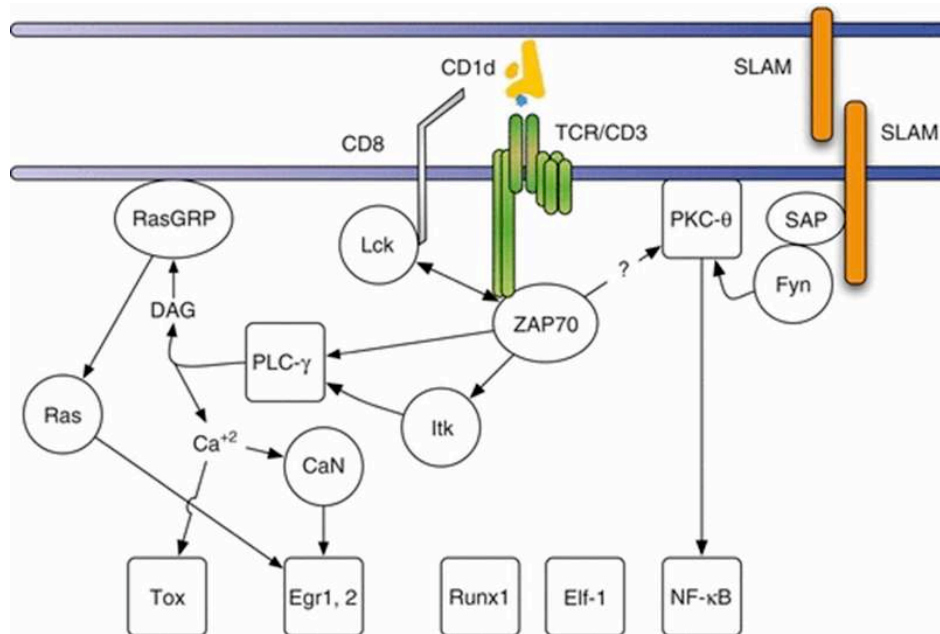


Figure 5 : Voies de signalisation induites par le TCR et les récepteurs SLAM.

Ce schéma montre quelques-uns des signaux de transduction impliqués dans les stades précoces du développement des lymphocytes iNKT, et quelques facteurs de transcription impliqués dans les stades de différenciation postérieurs. (Figure extraite de Hu et al. 2011)

En 2009, V. Lazarevic a montré qu'un autre facteur de transcription agit précocement sur le développement des lymphocytes iNKT, il s'agit d'Egr2 (Early growth response 2) qui est impliqué dans la sélection, la survie et la maturation des cellules iNKT (**Figure 6**). En effet, Egr2 a une expression forte et prolongée chez les précurseurs des cellules iNKT (Seiler et al. 2012) et permet la transition de la phase DP au stade 0. L'expression de ce facteur de transcription est dépendante de la voie Calcineurine/NFAT, soulignant l'importance du calcium et de l'activation initiale du TCR dans l'ontogénie des lymphocytes iNKT (Lazarevic et al. 2009).

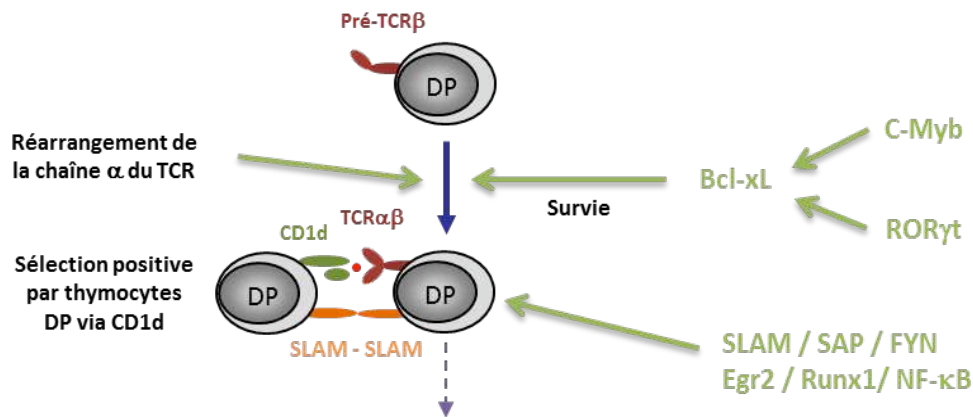


Figure 6 : Mécanismes de régulation des thymocytes DP précurseurs des lymphocytes iNKT. La première étape du développement des lymphocytes iNKT est caractérisée par le réarrangement de son TCR associé à de multiples signaux de survie médié par Bcl-xL. La sélection positive qui s'ensuit fait intervenir différents récepteurs qui vont permettre l'activation de plusieurs facteurs de transcription indispensables au développement des cellules iNKT.

En 2009, l'équipe de JC. Marie a montré le rôle régulateur essentiel du TGF- β dans la différenciation des cellules iNKT, et notamment à partir du stade 0. En effet ils ont décrit que le TGF- β intervient dans différentes étapes du développement et notamment directement après le stade DP lorsqu'il permet la survie des précurseurs via la maintenance de l'expression du récepteur de l'IL-7, la molécule CD127 (Doisne et al. 2009a), l'IL-7 étant une cytokine impliquée dans la survie des thymocytes.

La transition du stade 0 vers le stade 1 est permise par Gata-3, qui est le facteur de transcription agissant le plus précocement sur le développement des cellules iNKT. En effet il active le passage du stade 0 au stade 1 et la mise en place du programme fonctionnel de ces cellules. De ce fait son expression est associée à la forte production d'IL-4 par les cellules iNKT dès le stade 1 de différenciation (Kim et al. 2006 ; Wang et al. 2010) (**Figure 7**).

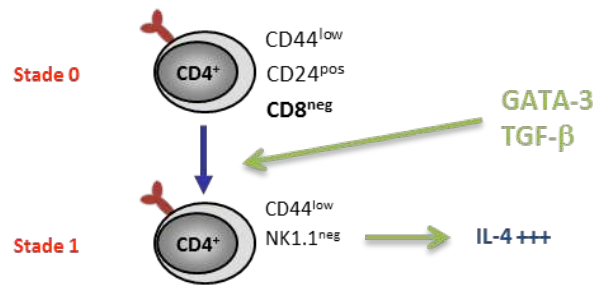


Figure 7 : Mécanismes de régulation de la transition du stade 0 au stade 1 des lymphocytes iNKT. La transition du stade 0 vers le stade 1 est régulée positivement par le facteur de transcription GATA-3, tandis que le TGF- β permet la survie de ces cellules iNKT immatures.

Le facteur de transcription « Promyelocytic leukemia zinc finger » (PLZF) est une protéine importante et spécifique pour l'acquisition massive du marqueur d'activation et de maturation CD44, c'est-à-dire pour le passage du stade 1 au stade 2. En effet, l'inactivation du gène codant pour PLZF entraîne un phénotype naïf des lymphocytes iNKT et leur attraction massive vers les ganglions lymphoïdes. PLZF jouerait donc un rôle essentiel dans l'acquisition des propriétés immuno-modulatrices et notamment dans l'acquisition des profils cytokiniques complet de ces cellules (Savage et al. 2008). En outre, tout récemment, l'équipe d'A. Bendelac a démontré que l'expression de PLZF est contrôlée par un autre facteur de transcription, Egr2. En effet, Egr2 a une expression forte et prolongée chez les précurseurs des cellules iNKT, et se lie et active directement le promoteur du gène codant pour le facteur de transcription PLZF, mais aussi le promoteur codant pour la chaîne β du récepteur de l'IL-2 et de l'IL-15, la molécule CD122. Egr2 permet ainsi de contrôler la réactivité des lymphocytes iNKT à l'IL-15, cytokine essentielle impliquée dans leur différenciation terminale (Seiler et al. 2012).

En 2004, il a été décrit que les souris déficientes pour le facteur de transcription T-bet montrent un nombre très restreint de cellules iNKT NK1.1^{pos}, indiquant que T-bet est indispensable à la maturation terminale des lymphocytes iNKT puisqu'il permet la transition du stade 2 au stade 3, l'acquisition du marqueur NK1.1 et l'acquisition de la capacité à produire de l'IFN- γ (Townsend et al. 2004 ; Ohteki et al. 1997). L'activation de T-bet est déclenchée par la signalisation de l'IL-15 via sa fixation sur son récepteur spécifique, la

molécule CD122 (Ohteki et al.1997 ; Castillo et al. 2010). Les expressions de T-bet et de CD122 sont alors contrôlées négativement par le TGF- β , ceci de manière directe ou indirecte (Doisne et al. 2009a), empêchant ainsi une maturation excessive des cellules iNKT.

En l'absence d'Itk, kinase de la famille des Tec, les cellules iNKT acquièrent l'expression de CD44, mais leur évolution est bloquée au stade 2, signifiant qu'il y a un défaut d'expression de CD69, CD122 et NK1.1. La survie des cellules iNKT est dépendante d'une voie de signalisation impliquant la protéine p53 (Qi et al. 2012). De plus, Itk semble indispensable à l'acquisition des propriétés fonctionnelles des lymphocytes iNKT, puisqu'ils sont incapables de produire les cytokines de type Th1 et Th2, l'IFN- γ et l'IL-4 (Au-Yeung et Fowell. 2007).

L'implication du GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor) dans le développement des lymphocytes iNKT a été mise en évidence en 1999, lorsque l'équipe de M. Taniguchi a montré que les souris déficientes pour le récepteur du GM-CSF ont un nombre fortement réduit de lymphocytes iNKT dans les tissus lymphoïdes par rapport à des souris sauvages (Sato et al. 1999). Par la suite, il a été décrit que les lymphocytes iNKT présents chez les souris déficientes pour le GM-CSF, ont un défaut de réponse aux stimulations antigéniques, suggérant un rôle prépondérant du GM-CSF dans les propriétés fonctionnelles de ces cellules. En effet, malgré une production normale de cytokines, les lymphocytes iNKT des souris déficientes pour le GM-CSF sont incapables de les sécréter car ils présentent un défaut de fusion des vésicules sécrétrices avec la membrane plasmique, empêchant ainsi une réponse correcte aux stimulations antigéniques (Bezbradica et al. 2006). Le rôle du GM-CSF dans le développement des cellules iNKT, et notamment dans l'acquisition de leurs propriétés fonctionnelles, est démontré par le fait que l'apport de GM-CSF exogène aux cellules iNKT thymiques des souris déficientes pour le GM-CSF rétablit les capacités sécrétoires de ces cellules, ce qui n'est pas le cas avec les cellules iNKT périphériques issus des mêmes souris (Bezbradica et al. 2006).

De plus, bien que l'IL-7 puisse favoriser la survie des lymphocytes thymiques *in vitro* et *in vivo*, c'est l'IL15 qui est nécessaire à la prolifération homéostatique des lymphocytes iNKT matures dans les organes lymphoïdes périphériques (Matsuda et al. 2002). En périphérie, la reconnaissance d'un ligand glycolipidique endogène présenté par des cellules exprimant

CD1d, est, de même, un élément déterminant pour la transition entre le stade 2 et le stade 3. En effet, l'absence de cellules présentatrices d'antigène via le CD1d en périphérie est associée à une accumulation de lymphocytes iNKT17 dans les organes lymphoïdes (McNab et al. 2005) (**Figure 8**). Cependant, l'interaction des lymphocytes iNKT matures avec des CPA CD1d^{pos} n'est pas nécessaire pour leur prolifération homéostatique et leur survie (Matsuda et al. 2002). Enfin, bien que la grande majorité des cellules iNKT récemment exportées du thymus passe au stade 3, une petite partie des cellules n'acquièrent pas le marqueur NK1.1 mais représente une population mature dans les organes lymphoïdes avec un phénotype stable et définitif (McNab et al. 2007). Ces lymphocytes iNKT NK1.1^{neg} sont retrouvés en abondance dans les ganglions lymphatiques et l'épithélium de la peau, où ils représentent jusqu'à 80% des lymphocytes iNKT totaux de ces organes (Doisne et al. 2009b).

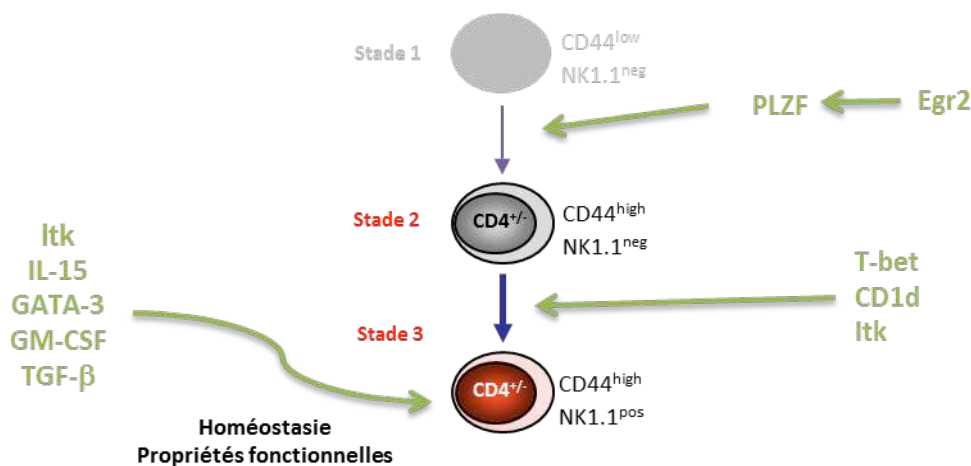


Figure 8 : Mécanismes de régulation de la maturation terminale des lymphocytes iNKT.

Les derniers stades de maturation sont très finement contrôlés et font intervenir des cascades d'activation ainsi que des mécanismes d'activation parallèles médiées par diverses cytokines et divers facteurs de transcription.

Ainsi, l'ontogénie des lymphocytes iNKT est un processus extrêmement contrôlé et nécessitant l'action de nombreuses molécules à des étapes bien précises. La totalité de ces signaux est indispensable au bon développement et à la bonne fonctionnalité de ces cellules,

étant donné que les souris déficientes pour l'une ou l'autre de ces molécules montrent des défauts numériques ou des altérations des propriétés fonctionnelles des lymphocytes iNKT (Figure 9).

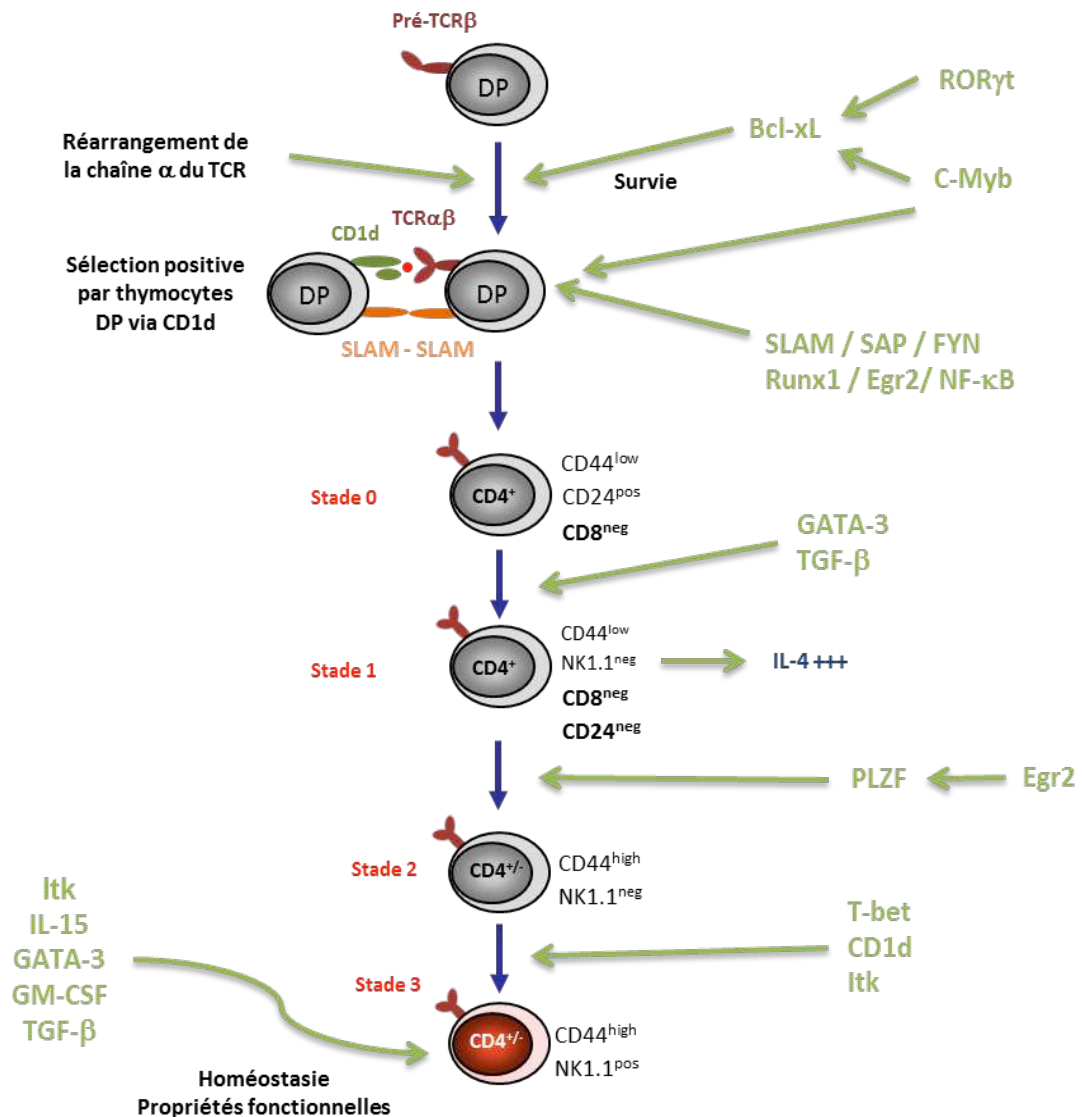


Figure 9 : Schéma général du développement des lymphocytes iNKT.

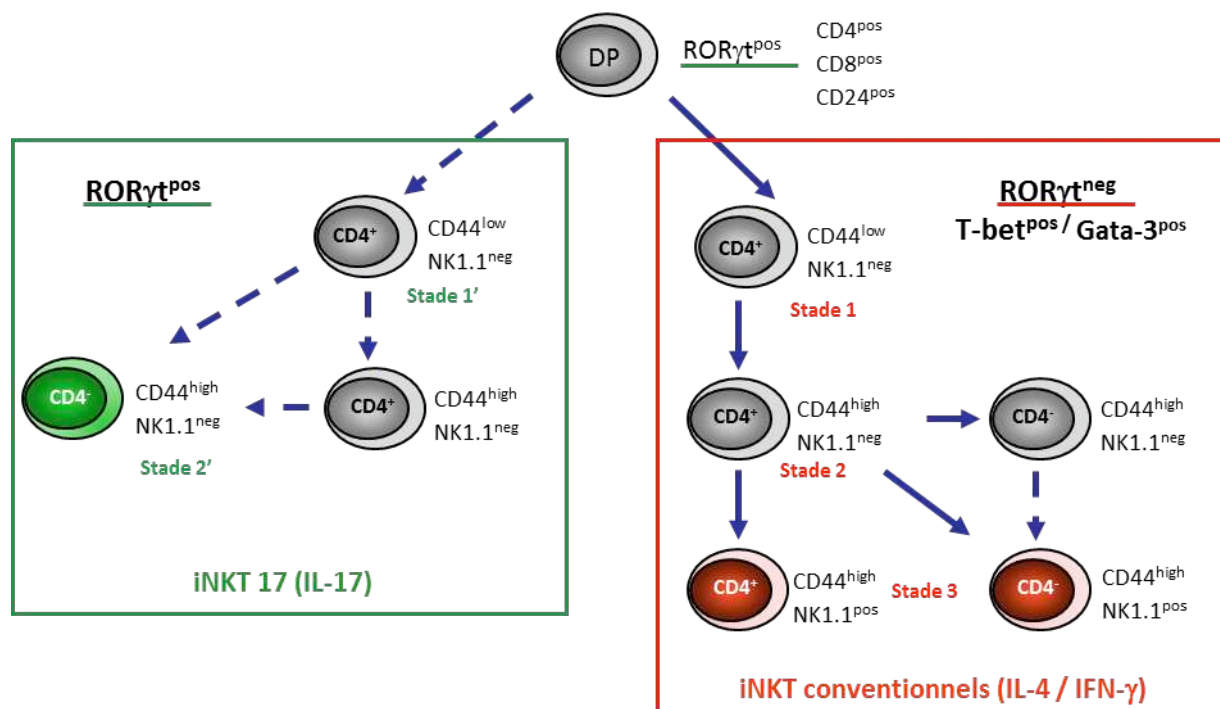
L'ontogénie des lymphocytes iNKT nécessite le réarrangement du TCR semi-invariant Va14-Ja18, des signaux de survie multiples, et une maturation terminale et une homéostasie contrôlées par de nombreux facteurs.

Développement des lymphocytes iNKT17 versus iNKT conventionnels

Le développement des lymphocytes iNKT17 est encore très peu étudié alors que celui des lymphocytes iNKT conventionnels est relativement bien connu, comme nous l'avons expliqué précédemment. Cependant les études du laboratoire ont permis de proposer un modèle de différenciation des sous-populations des lymphocytes iNKT basé sur l'expression du facteur de transcription ROR γ t (Michel et al. 2008). Dans ce modèle, nous supposons que l'expression de ROR γ t est conservée après le stade DP chez les cellules iNKT17 alors qu'elle est éteinte chez les cellules iNKT conventionnelles laissant ainsi les autres facteurs de transcription, décrits précédemment, s'exprimer et orienter les cellules iNKT vers un profil fonctionnel conventionnel (**Figure 10**). D'autre part, le marqueur CD4 disparaît dès le stade 1', le marqueur NK1.1, autrefois considéré comme caractéristique des lymphocytes iNKT, n'est exprimé à aucun stade, alors que le récepteur de chimiokine CCR6 n'est exprimé que par les lymphocytes iNKT17 (Doisne et al. 2009).

Concernant les facteurs de transcription impliqués dans le développement des lymphocytes iNKT, nous avons déterminé l'expression continue de ROR γ t, lors des différents stades de maturation et au stade mature effecteur permettant la production d'IL-17 (Michel et al. 2008). Nous avons également déterminé que les lymphocytes iNKT17 n'expriment ni le facteur de transcription T-bet, associé au gène codant pour l'IFN- γ , ni le facteur de transcription Gata-3, associé à un phénotype Th2 (**Figure 10**). Une étude récente ayant démontré l'implication des facteurs de la famille NF- κ B, RelA et RelB, dans la production d'IL-17 par les lymphocytes innés T γ δ , il était légitime de se demander s'ils étaient également impliqués dans l'ontogénie ou les fonctions effectrices des lymphocytes iNKT17 (Powolny-Budnicka et al. 2011). L'équipe de Dr. Godfrey a ainsi démontré qu'aucun des facteurs de transcription de la famille NF- κ B, RelA et RelB ou NF- κ B lui-même, ne sont importants pour le développement ou les fonctions effectrices des lymphocytes iNKT17 puisque la déficience pour l'un ou l'autre de ces facteurs n'entraîne aucune anomalie numérique ou fonctionnelle de ces cellules (Stankovic et al. 2011). De même, les cellules iNKT issues de souris déficientes en IL-6 montrent une forte production d'IL-17 en réponse à une stimulation par l'anti-CD3 associé à l'IL-23. Cela indique que le développement et

l'acquisition des fonctions effectrices des cellules iNKT productrices d'IL-17 est indépendante de l'IL-6, pourtant primordiale pour le développement des lymphocytes Th17 (Rachitskaya et al. 2008)



Erreur ! Source du renvoi introuvable.

Figure 10 : Modèle de développement thymique des cellules iNKT. La majorité des cellules précurseurs des iNKT va perdre l'expression du facteur RORγt et devenir des cellules productrices d'IL-4 et d'IFN-γ (iNKT conventionnels), alors qu'une fraction va rester RORγt positive et devenir des cellules productrices d'IL-17 (iNKT 17).

Une étude très récente vient de montrer que, en plus de son rôle dans le développement des lymphocytes iNKT conventionnels, le TGF-β jouerait un rôle important dans la voie de différenciation des lymphocytes iNKT17. Ainsi, de même que pour les cellules iNKT conventionnelles, le TGF-β prévient l'apoptose des thymocytes iNKT RORγt^{pos} par un mécanisme dépendant de la voie SMAD4 (Havenar-Daughton et al. 2012), et permet la maintenance du récepteur de l'IL-7, CD127 (Doisne et al. 2009). Par ailleurs, la surexpression du TGF-β entraîne un défaut de l'expression de NK1.1 et une réduction de la production

d'IFN- γ par les cellules iNKT, suggérant un contrôle négatif des lymphocytes iNKT conventionnels par le TGF- β (Doisne et al. 2009). De plus il a été démontré que les lymphocytes iNKT17 expriment des taux plus faibles du récepteur de l'IL-15, mais des taux plus élevés du récepteur du TGF- β , par rapport aux lymphocytes iNKT conventionnels (Havenar-Daughton et al. 2012), suggérant une sensibilité accrue au TGF- β .

Sortie du thymus, migration en périphérie et localisation tissulaire

Les lymphocytes iNKT résidents du foie ou de la rate sont majoritairement NK1.1^{neg}, suggérant qu'il s'agit soit de lymphocytes iNKT17 soit de lymphocytes iNKT conventionnels immatures du stade 2 (Pellicci et al. 2002), alors que la majorité des lymphocytes iNKT du thymus présentent un phénotype mature du stade 3, c'est-à-dire NK1.1^{pos}. Ainsi, une fraction des lymphocytes iNKT NK1.1^{neg} ne va pas émigrer en périphérie mais va évoluer vers le phénotype mature NK1.1^{pos}, devenant alors une population de cellules iNKT résidentes à long terme du thymus (jusqu'à un an) (Berzins et al. 2006). Par ailleurs, il a été montré que les lymphocytes iNKT émigrés thymiques récents sont NK1.1^{neg} et qu'ils finissent rapidement leur maturation en périphérie, la majorité devenant ainsi porteuse du marqueur NK1.1 (Pellicci et al. 2002 ; Benlagha et al. 2002). Récemment, notre laboratoire a démontré que la Neuropiline-1 (Nrp-1) est un marqueur des précurseurs iNKT thymiques jusqu'au stade 2 en général, c'est-à-dire des lymphocytes iNKT NK1.1^{neg}, et des lymphocytes iNKT émigrés thymiques récents en périphérie (iNKT conventionnels et iNKT17). La molécule de Nrp-1 est un récepteur transmembranaire exprimé notamment par les thymocytes immatures. Elle constitue une molécule importante dans la médiation de diverses fonctions cellulaires comme la migration, la prolifération, l'adhésion et l'apoptose cellulaires. De plus, il a été décrit que la maturation des lymphocytes iNKT s'accompagne d'une perte de l'expression membranaire de Nrp-1 (Pellicci et al. 2002 ; Milpied et al. 2011 : **voir en annexe**). Toutefois la prolifération des cellules iNKT induite par l'activation du TCR est corrélée avec l'expression *de novo* de Nrp-1 indiquant que Nrp-1 pourrait être un marqueur de l'activation par le TCR.

Les mécanismes d'export des lymphocytes iNKT du thymus vers la périphérie ne sont pas clairement établis, toutefois il est décrit que, à l'instar des lymphocytes T conventionnels,

l'expression du récepteur S1P1 par les cellules iNKT est requise pour leur distribution tissulaire normale (Allende et al. 2008). Un rôle similaire est conféré aux lymphotoxines α et β , puisque les souris déficientes pour ces cytokines montrent un déficit numérique en cellules iNKT au niveau de la périphérie comparativement aux souris sauvages, sans déficit numérique au niveau du thymus (Franki et al. 2006).

Chez la souris, la distribution tissulaire des lymphocytes iNKT est bien connue et très variable d'un organe à l'autre : ils représentent environ seulement 0,5% des lymphocytes totaux du sang périphérique et des ganglions lymphoïdes périphériques, mais leur fréquence est plus importante dans la rate (2,5% des lymphocytes T) et particulièrement dans le foie où ils représentent plus de 10% de la population T (Bendelac et al. 2007). Chez l'Homme, la fréquence des lymphocytes iNKT dans les divers organes est bien moins étudiée mais on peut dire qu'elle est approximativement divisée par 10 dans les différents organes en comparaison de la souris.

Activation des lymphocytes iNKT

L'identification d'antigènes microbiens des cellules iNKT fournit une explication sur l'activation de ces cellules par certains micro-organismes, mais n'explique pas leur capacité à s'activer en réponse à des micro-organismes dont aucun antigène ne peut être reconnu par les cellules iNKT ou encore lors de réponses inflammatoires ou auto-immunes. Deux modèles d'activation des cellules iNKT ont alors été proposés, une voie directe et une voie indirecte (**Figure 11**).

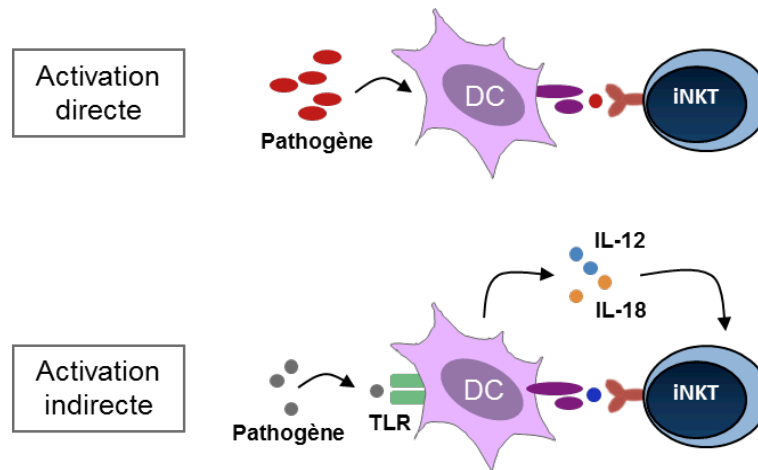


Figure 11 : Modèles d'activation des cellules iNKT. Les cellules iNKT sont activées par présentation antigénique par le CD1d des cellules présentatrices d'antigène (voie directe) ou par les cytokines IL-12 et IL-18 produites par les cellules présentatrices d'antigène via l'activation de leur voie des TLR (voie indirecte). (Adapté de Tupin et al. 2007)

La voie directe implique la reconnaissance par le TCR semi-invariant des lymphocytes iNKT de glycolipides microbiens spécifiques issus de la dégradation lysosomale des membranes de pathogènes après phagocytose par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Cette voie constitue le mode d'activation principal des lymphocytes iNKT et permet une réponse efficace à l'infection par les bactéries *Borrelia* ou *Sphingomonas* par exemple. A l'inverse, la voie indirecte implique la reconnaissance d'antigènes du soi ou de pathogènes ne contenant pas de glycolipides agonistes des lymphocytes iNKT, en présence ou non de cytokines agissant comme facteurs de co-stimulation (IL-12 et IL-18) produites par les cellules présentatrices d'antigènes en réponse à une stimulation de type TLR (Tupin et al. 2007). En effet, il a été montré que, chez l'Homme, la réponse des cellules iNKT à l'infection par *Salmonella typhimurium* via l'interaction TCR-CD1d est amplifiée par la production d'IL-12 par les cellules dendritiques (Brigl et al. 2003). Une autre étude a rapporté que, en réponse aux antigènes de *Schistosoma mansoni*, les cellules iNKT peuvent être activées par des antigènes du soi présentés par CD1d, même en absence d'un signal de la voie des TLR ou d'IL-12 (Mallevaey et al. 2006). Par ailleurs, notre laboratoire a démontré, il y a quelques années, que l'association des cytokines pro-inflammatoires IL-18 et IL-12 peut activer les cellules iNKT en l'absence d'engagement du TCR (Leite-de-Moraes et al. 1999). Ces résultats ont ensuite été complétés par la démonstration que les lipopolysaccharides (LPS)

d'*Escherichia coli* induisent la production des cytokines IL-18 et IL-12 par les cellules dendritiques, ce qui va permettre l'activation des cellules iNKT sans implication de leur TCR (Nagarajan and Kronenberg. 2007), ce qui indique qu'une stimulation cytokinique des cellules iNKT peut suffire à les activer.

Après leur activation, notre laboratoire a décrit que les lymphocytes iNKT subissent une mort cellulaire induite par l'activation (AICD) médiée par l'interaction Fas/FasLigand (Leite-de-Moraes et al. 2000). Cependant, il a également été démontré qu'une partie des lymphocytes iNKT internalisent rapidement le complexe TCR/CD3 ainsi que certains marqueurs de surface comme NK1.1, donnant l'impression que ces lymphocytes subissent une apoptose massive (Wilson et al. 2003 ; Crowe et al. 2003). Ils deviennent ainsi indétectables durant les 12 à 24 heures post-activation, phase durant laquelle les lymphocytes iNKT subissent une prolifération intense puis une ré-externalisation du TCR permettant de nouveau leur détection par cytométrie (Uldrich et al. 2005 ; Wilson et al. 2003 ; Crowe et al. 2003). Au 3^{ème} jour après activation, le nombre de cellules iNKT peut représenter jusqu'à 10 fois le nombre normal de cellules iNKT in vivo, puis survient alors une phase de rétraction jusqu'à ce que la population de cellules iNKT ré-atteigne son nombre moyen, entre le 6^{ème} et le 9^{ème} jour après activation (Uldrich et al. 2003). Après activation, les lymphocytes iNKT subissent une longue phase d'anergie, durant laquelle ils ne répondront pas, ou très peu, à une nouvelle stimulation de leur TCR (Chang et al. 2008). Cette anergie est le résultat d'une stimulation très intense du TCR dépendante de signaux de co-stimulation efficaces et semble être associée à une expression importante de PD-1 (« programmed-death 1) (Chang et al. 2008 ; Iyoda et al. 2010).

Diversité fonctionnelle des lymphocytes iNKT

L'activation des lymphocytes iNKT entraîne une intense prolifération et une sécrétion prolongée de cytokines, parmi lesquelles l'IL-4 et l'IFN- γ , le « Tumor Necrosis Factor » (TNF)- α , l'IL-5, l'IL-13, l'IL-17 ou l'IL-22. Chez l'Homme, il existe une dichotomie précise entre les

lymphocytes iNKT CD4⁺, qui produisent à la fois des cytokines de type Th1 et de type Th2, et les lymphocytes iNKT DN, ayant un profil strictement Th1 (Lee et al. 2002 ; Gumperz et al. 2002). Dans le modèle murin, cette séparation fonctionnelle entre les cellules iNKT porteuses ou non du CD4 n'est pas applicable, en revanche, le marqueur NK1.1 est un facteur de discrimination des sous-populations de cellules iNKT. Ainsi les cellules iNKT NK1.1^{pos} ont un profil Th1 et Th2, alors que les cellules iNKT NK1.1^{neg} ont un profil plutôt Th17 (Michel et al. 2007 ; Bendelac et al. 2007). De plus la conformation des ligands des lymphocytes iNKT peut conférer une avidité différente aux cellules et biaiser la réponse cytokinique. Dans le cas d'analogues synthétiques de l' α GalCer, l'introduction de groupements phényles dans la queue lipidique peut biaiser la réponse des cellules iNKT vers une réponse Th1 et ainsi améliorer l'efficacité de traitements anti-cancéreux (Wu et al. 2011), alors que certains ligands comme l'OCH vont orienter la réponse vers un profil Th2 avec toutefois une avidité moins importante que l' α GalCer (Sullivan et al. 2010). Ainsi la production cytokinique des cellules iNKT, primordiale dans leur rôle immuno-régulateur, est modulée en fonction du sous-type de cellules iNKT impliquée, du ligand activateur mais aussi de la cellule présentatrice d'antigène requise et de l'environnement cytokinique.

De plus, l'activation des lymphocytes iNKT humains par l' α GalCer ou par la cytokine pro-inflammatoire IL-12 entraîne une activité cytolytique résidant dans l'expression de perforine et de ligands de Fas, dont FasL (Fas Ligand) et CD95L permettant notamment une réponse non-spécifique envers les cellules tumorales *in vitro* (Gumperz et al. 2002) (**Figure 12**).

L'expression de molécules de co-stimulation après activation permet aux lymphocytes iNKT d'influencer l'état d'activation ou de maturation de différentes cellules du système immunitaire. Ainsi, après une activation des lymphocytes iNKT par l' α GalCer, les cellules expriment fortement et rapidement la molécule de CD40L qui, à son tour, en se liant à son récepteur CD40, va permettre la maturation des cellules dendritiques et l'activation des lymphocytes B qui vont pouvoir sécréter des anticorps (Cerundolo et al. 2009). La maturation des cellules dendritiques inclut l'augmentation de l'expression de CD86, la production d'IL-12 et entraîne l'augmentation du « priming » des lymphocytes T. D'autre part, en 2009, l'équipe d'A. Lehuen a mis en évidence que l'activation des lymphocytes iNKT lors d'une réponse anti-virale induit l'expression de la molécule OX40 entraînant la

production d'IFN de type I (IFN- α) par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) via une interaction avec la molécule OX40L (Diana et al. 2009) (**Figure 12**).

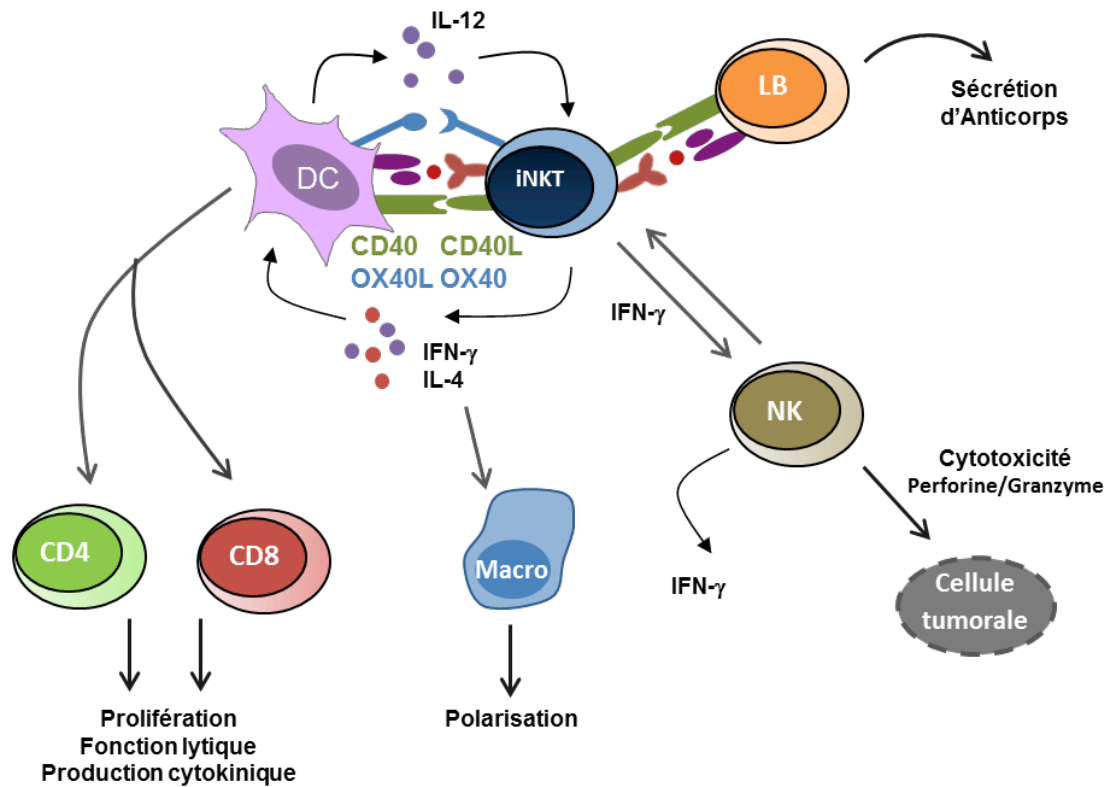


Figure 12 : Interaction des lymphocytes iNKT avec les autres cellules du système immunitaire. Les lymphocytes iNKT peuvent moduler directement ou indirectement les fonctions de nombreux types cellulaires, comme les cellules NK et les lymphocytes T. Les interactions sont bidirectionnelles, les cellules iNKT reçoivent des signaux des APC (DCs entre autres) et réciproquement. Les signaux peuvent être reçus via les récepteurs membranaires, comme le TCR, via des récepteurs de co-stimulation, et via des médiateurs solubles, comme les cytokines. (Adapté de Cerundolo et al. 2009)

Fonctions des lymphocytes iNKT en physiopathologie

Les propriétés immunorégulatrices conférées aux lymphocytes iNKT reposent principalement sur leur capacité à produire rapidement et massivement des cytokines pro-Th1 et pro-Th2, notamment l'IL-4 et l'IFN- γ . De ce fait, les lymphocytes iNKT suscitent de grands intérêts dans les domaines de l'immunité anti-tumorale, anti-infectieuse ainsi que dans la recherche de traitements des maladies autoimmunes et allergiques (Cui J, et al. 1997 ; Faveeuw C, et al. 2002 ; Kawakami K, et al. 2003 ; Sharif S, et al. 2001, Akbari O, et al. 2003 ; Lisbonne M, et al. 2003 ; Hachem et al. 2005). A titre d'exemple, il a été décrit que les lymphocytes iNKT, via leur capacité à promouvoir des réponses pro-Th1, favorisent l'immunité anti-infectieuse et anti-tumorale (Nieuwenhuis EE, et al. 2002 ; Smyth MJ, et al. 2000).

Lymphocytes iNKT et tumeur. L'importance primordiale des lymphocytes iNKT dans la surveillance tumorale est bien décrite dans les modèles murins. La réduction de leur fréquence entraîne une prédisposition au développement tumoral, alors que le transfert adoptif ou la stimulation des cellules iNKT fournit une protection efficace contre les cancers (Smyth et al. 2000 ; Terabe et al. 2008). L'effet anti-tumoral des cellules iNKT est basé sur leur capacité à produire très rapidement de grandes quantités d'IFN- γ (Terabe et al. 2008). L'IFN- γ va permettre l'activation des cellules NK et des cellules T CD8⁺ cytotoxiques, dont le fort potentiel cytotoxique va entraîner la destruction des cellules tumorales, et va activer les cellules dendritiques productrices d'IL-12. Dans certains cas, la déficience en cellules iNKT au niveau des tumeurs peut être réversée par l'ajout de ligands, comme l' α GalCer, associé à l'IL-12. Les premières étapes d'essais cliniques ont montré un fort potentiel de reconstitution de la réponse IFN- γ des cellules iNKT (Exley et al. 2011) et ont pour le moment apporté des résultats prometteurs dans les traitements anti-tumoraux.

Lymphocytes iNKT et infections. La spécificité des cellules iNKT pour certains lipides bactériens et parasitaires suggèrent que ces cellules sont capables de moduler l'immunité

contre les infections. La reconnaissance de peptides glycolipidiques issus de *Borrelia burgdorferi* ou de *Sphingomonas sp.* par les lymphocytes iNKT suggère que ces cellules peuvent jouer un rôle prédominant dans le contrôle de la maladie de Lyme ou dans la prévention des maladies nosocomiales (Brigl et al. 2010). D'autre part, l'activation des lymphocytes iNKT par les lipides issus d'œufs de *Schistosoma mansoni*, permet l'induction d'une forte réponse de type Th2 contrôlant l'infection, soulignant le rôle de ces cellules dans les événements immunologiques précoces associés à la pathologie (Faveeuw et al. 2002).

Les lymphocytes iNKT participent aussi à l'immunité anti-virale. En effet, comme il a été décrit précédemment, la déficience de la molécule SAP entraîne une absence des cellules iNKT (Pasquier et al. 2005 ; Nichols et al. 2005). La suggestion indirecte de l'implication de ces cellules dans le contrôle de l'infection par le virus Epstein-Barr (EBV) vient du fait que les patients atteints du syndrome XLP (dû à une déficience en Xiap, homologue humain de SAP) ont une susceptibilité accrue à l'infection par EBV (Gaspar et al. 2002). Par ailleurs, dans le cadre d'une infection par le virus de la grippe Influenza A, les lymphocytes iNKT jouent un rôle protecteur car ils sont capables de produire de l'IL-22, cytokine ayant un rôle positif dans le contrôle des lésions subies par les cellules épithéliales pulmonaires (Paget et al. 2012). En outre, les lymphocytes iNKT sont considérablement affectés par le virus de l'immunodéficience humaine (HIV-1), dans leur nombre et dans leur fonction (Li et Xu. 2008 ; Unutmaz. 2003), suggérant que ces cellules pourraient jouer un rôle dans cette pathologie. Les lymphocytes iNKT CD4^{pos} expriment le principal récepteur utilisé par le HIV pour entrer dans la cellule, et de plus, la majorité des cellules iNKT expriment le co-récepteur CCR5 (Kim et al. 2002). De manière intéressante, le nombre de lymphocytes iNKT CD4^{pos} est inversement corrélé avec la charge virale (Motsinger et al. 2002 ; Van der Vliet et al. 2002) et ces cellules sont sélectivement déplétées lorsqu'elles sont exposées au HIV-1 *in vitro* (Sandberg et al. 2002), suggérant que les cellules iNKT CD4⁺ sont des cellules cibles lors de l'infection par le virus HIV-1.

Lymphocytes iNKT et asthme allergique. De nombreuses études ont impliqué les lymphocytes iNKT dans les pathologies allergiques, et notre laboratoire est particulièrement

intéressé par l'implication de ces cellules dans l'asthme allergique. Ainsi, du fait de leur versant Th2, il a été décrit que les lymphocytes iNKT peuvent avoir des effets délétères dans l'asthme notamment, via leur production d'IL-4 et d'IL-13. Dans ce contexte, notre laboratoire a mis en évidence que les souris $J\alpha 18^{-/-}$ (déficientes exclusivement en cellules iNKT $V\alpha 14J\alpha 18$) ont une nette diminution des symptômes d'asthme allergique (Lisbonne et al. 2003). De plus, il a été démontré que le transfert adoptif des cellules iNKT sauvages à des souris $J\alpha 18^{-/-}$, déficientes en cellules iNKT, restaurait les symptômes caractéristiques de la maladie, l'inflammation et l'hyperréactivité des voies respiratoires, contrairement au transfert adoptif de cellules iNKT de souris déficientes en IL-4 et en IL-13 (Akbari, et al. 2003). Notre laboratoire a également décrit que la fréquence des lymphocytes iNKT est augmentée dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (BALF) des voies respiratoires d'enfants atteints d'asthme sous une forme sévère (Pham-Thi et al. 2006 a et b). Toutefois d'autres études n'ont pas relevé les mêmes résultats, mais il est important de noter ici que la sévérité de la maladie et les différents traitements utilisés pour la contrôler sont des facteurs cruciaux pour l'analyse et la compréhension des mécanismes impliqués (Thomas et al. 2006). Ces résultats supportent la notion que les lymphocytes iNKT jouent un rôle primordial dans la sévérité de cette pathologie.

Lymphocytes iNKT et auto-immunité. Les indices ayant permis d'établir que les lymphocytes iNKT peuvent avoir une influence dans les pathologies auto-immunes vient du fait que diverses souches de souris naturellement susceptibles aux maladies auto-immunes ont un défaut dans la fréquence de cellules iNKT et/ou dans leur fonction (Wu et Van Kaer. 2009). Par exemple, les souris diabétiques non-obèse (NOD) montrent un déficit important en cellules iNKT ainsi qu'un déficit de la production cytokinique de ces cellules (Gombert et al. 1996 a et b), mais le transfert adoptif de lymphocytes iNKT ou la surexpression du TCR caractéristiques des cellules iNKT peuvent prévenir le développement du diabète auto-immun chez ces souris (Lehuen et al. 1998). De même, la stimulation répétée des cellules iNKT avec l' α GalCer (Sharif et al. 2001) ou la surexpression de la molécule de CD1d (Wang et al. 2001) préviennent aussi le développement de la pathologie.

Dans la pathologie du greffon contre l'hôte (« Graft versus host disease », GVHD), complication majeure observée lors de greffes de cellules souches hématopoïétiques, les lymphocytes iNKT du donneur inhibent le développement du rejet de greffe (Kohrt et al. 2010). Tout récemment, chez l'Homme, une étude a permis de montrer que les cellules iNKT CD4⁺ dans les greffons de cellules hématopoïétiques sont associées à une protection contre la GVHD aigüe (Chaidos et al. 2012), suggérant que la fréquence de ces cellules dans les greffons constitue un facteur prédictif de la pathologie. Dans le même sens, notre laboratoire vient de publier des résultats permettant d'établir des prédictions de l'apparition de GVHD aigüe chez les patients allo-greffés. En effet, plus le ratio NKT/T est élevé durant les 90 jours post-transplantation, plus les risques de développer une GVHD sont faibles. De plus, au jour 15 après la transplantation, un ratio NKT/T proche de $0,58 \times 10^3$ est associé avec une diminution de 94% du risque de développer une GVHD. Ces résultats sont primordiaux dans la prédiction des complications et pour l'établissement d'une prophylaxie efficace chez les patients sujets à des greffes de cellules souches hématopoïétiques (Rubio et al. 2012, sous presse).

Lymphocytes iNKT et obésité. L'obésité est une maladie multifactorielle devenue un problème majeur de santé publique. Le rôle des lymphocytes dans cette pathologie est investigué depuis peu, cependant une récente étude a démontré que l'activation des lymphocytes iNKT dans les cas d'obésité a un impact significatif sur les réponses inflammatoires et sur la tolérance au glucose. En effet, la fréquence des lymphocytes iNKT est nettement diminuée chez les souris et chez les patients atteints d'obésité, toutefois l'activation de ces cellules par l' α GalCer entraîne la polarisation des macrophages de type M2 au niveau des tissus adipeux, via la voie de signalisation IL-4/STAT6, et permet ainsi une régulation du métabolisme du glucose (Ji et al. 2012).

II – Interleukine 17 et interleukine 22

Caractérisation

L'IL-17, également appelée IL-17A, fait partie d'une famille de cytokines composée de 6 membres, l'IL-17A, l'IL-17B, l'IL-17C, l'IL-17D, l'IL-17E (aussi connue comme IL-25) et l'IL-17F (Kawaguchi M, et al. 2004). Cet ensemble de cytokines existe aussi bien chez la souris que chez l'Homme. L'IL-17A et l'IL-17F partagent une séquence d'homologie proche et peuvent toutes deux se lier à un récepteur dimérique composé des chaînes IL-17RC et IL-17RA. Ce récepteur est très largement exprimé, aussi bien par des cellules hématopoïétiques (les lymphocytes B, les mastocytes ou les thymocytes) que des cellules non-hématopoïétiques (c'est-à-dire les cellules épithéliales, les cellules fibroblastiques ou les cellules endothéliales) (Korn et al. 2009). A l'origine, l'IL-17 a été caractérisée comme une cytokine sécrétée par une sous-population particulière de lymphocytes CD4^{pos}, appelée Th17, aussi capable de sécréter de l'IL-22, de l'IL-21 et de l'IL-17F. Elle est, en réalité, aussi produite par plusieurs cellules de l'immunité innée, les lymphocytes iNKT17, les lymphocytes T $\gamma\delta$ et les cellules LTi (Lymphoid tissue-inducer) (Michel et al. 2007 ; Sutton et al. 2009 ; Takatori et al. 2009). Récemment l'équipe de B. Silva-Santos a montré que, durant le développement thymique, les lymphocytes T $\gamma\delta$ CD27⁺ expriment des taux élevés du facteur de transcription T-bet et d'IFN- γ , alors que les lymphocytes T $\gamma\delta$ CD27⁻ expriment constitutivement le facteur ROR γ t, deviennent producteurs d'IL-17 (Ribot et al. 2009), et sont localisés au niveau des poumons et du derme (Lochner et al. 2008). Par ailleurs, il a été décrit qu'une stimulation des lymphocytes T $\gamma\delta$ avec une combinaison des cytokines IL-1 β et IL-23 induit la production d'IL-17 indépendamment du TCR et que l'activation du récepteur aryl hydrocarbure (AhR) permet la co-production d'IL-22 par les lymphocytes T $\gamma\delta$ producteurs d'IL-17 (Martin et al. 2009). Quant à elles, les cellules LTi sont largement représentées dans le tractus intestinal, notamment dans la lamina propria intestinale, et requièrent également le facteur de transcription ROR γ t pour leur développement et leurs fonctions (Sawa et al. 2010 ; Cherrier et al. 2012).

Voie de signalisation et signal de transduction

L'interaction entre l'interleukine 17 et son récepteur active une voie de transduction de type NF- κ B et induit la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β ou l'IL-6 (Yao Z, et al. 1997). La partie intracytoplasmique du récepteur interagit avec une molécule adaptatrice Act1. Act1 va permettre, notamment via une interaction avec d'autres molécules comme l'ubiquitine ligase TRAF3 et 6 ou la kinase TAK1, l'activation des kinases IKK, impliquée dans la voie de signalisation NF- κ B, et « mitogen-activated protein » (MAP) impliquée dans la stabilisation des ARN messagers (Gaffen SL. 2009) (**Figure 13**).

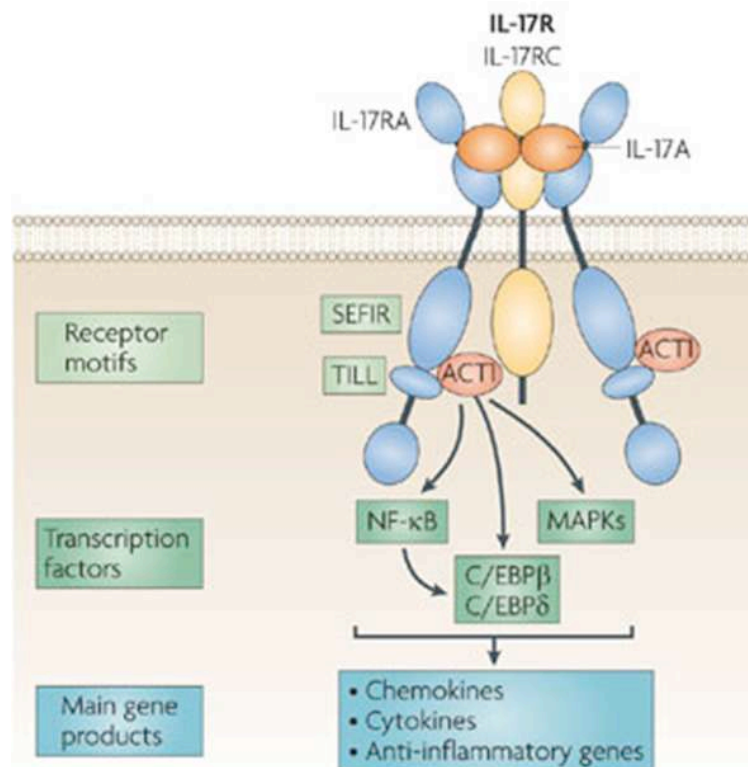


Figure 13 : Voies de signalisation du récepteur de l'IL-17. Le complexe IL-17R est composé de la chaîne IL-17RA et de la chaîne IL-17RC. Les fragments intra-cytoplasmiques contiennent des domaines SEFIR et TIR1 associables à la molécule adaptatrice Act1. La transduction du signal va activer la voie des MAPKs et le facteur de transcription NF- κ B. (Extrait de Gaffen SL. 2009)

Fonctions de l'interleukine 17

Fonctionnellement l'IL-17 intervient dans différents systèmes. Cette cytokine joue notamment un rôle important dans la granulopoïèse. En effet, elle induit la sécrétion, par les cellules épithéliales, de G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor), permettant la différenciation terminale des granulocytes, et de GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor), soutenant la maturation des progéniteurs des neutrophiles. L'IL-17 peut aussi stimuler la sécrétion de TNF- α et d'IL-1 β par les monocytes, et augmenter la libération de chimiokines attractantes de type CXC. Au niveau des poumons, elle favorise ainsi la différenciation et le recrutement des neutrophiles dans le modèle murin (Michel et al. 2007). Plus précisément, en présence d'IL-4, d'IL-13 et d'IFN- γ , elle induit la production d'IL-8, une chimiokine aussi appelée CXCL8 (Kawaguchi M et al, 2004), qui permet le recrutement de neutrophiles impliqués dans les formes d'asthme sévère.

De manière importante et de manière générale, les taux d'IL-17, dans les différents organes concernés ou dans le sang, sont élevés dans différentes pathologies auto-immunes, dont la sclérose en plaques, l'asthme, le psoriasis, les maladies chroniques intestinales ou la polyarthrite rhumatoïde (Hemdan et al. 2010).

Maladies chroniques intestinales. Des données récentes ont mis en évidence que les lymphocytes Th17 infiltrant les tissus sont présents dans diverses maladies inflammatoires chroniques, incluant la polyarthrite rhumatoïde, la sclérose en plaques, l'IBD (Inflammatory Bowel Disease) ou encore l'asthme allergique (Annunziato et al. 2007 ; Kleinschek et al. 2009 ; Pene et al. 2009). Pour exemple, les biopsies des tissus inflammés des colons de patients atteints de la maladie de Crohn ou de colite ulcéreuse ont montré des taux élevés d'IL-17 (Nielsen et al. 2003). De plus, les lymphocytes T CD4^{pos} du sang périphérique ou des tissus inflammés produisent des taux élevés d'IL-17, suggérant un rôle primordial de l'IL-17 dans l'IBD (Annunziato et al. 2007 ; Kleinschek et al. 2009). D'autres données montrent que l'IL-17 exerce une fonction inhibitrice sur la prolifération des cellules épithéliales intestinales (Schwartz et al. 2005), ce qui suggère que, en plus de sa contribution dans l'inflammation et les dommages tissulaires lors d'une IBD, l'IL-17 empêcherait les mécanismes de régénération nécessaires à la maintenance de l'intégrité tissulaire du tractus intestinal.

Encéphalomyélite auto-immune expérimentale. L'EAE (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis) est un modèle d'étude murin de la sclérose en plaques, maladie impliquant une démyélinisation des fibres nerveuses du système nerveux central. Les souris déficientes pour le facteur de transcription ROR γ t, l'IL-17 ou l'IL-23 sont moins susceptibles à l'EAE que le sont les souris sauvages, ce qui suggère que l'IL-17 et l'IL-23 sont des effecteurs importants dans le développement de l'EAE (Ivanov et al. 2006 ; Komiyama et al. 2006 ; Langrish et al. 2005). De plus, le transfert adoptif de cellules Th17 polarisées par l'IL-23 induit une paralysie ascendante chez les souris traitées, caractéristique de l'EAE (Kroenke et al. 2008). Enfin, il a été montré que l'expression du récepteur CCR6, caractéristique des cellules Th17, est nécessaire et suffisante pour l'attraction des lymphocytes Th17 dans le système nerveux central et pour l'induction de l'EAE (Reboldi A, et al. 2009).

Polyarthrite rhumatoïde. De manière assez similaire à la sclérose en plaques chez l'Homme, et au modèle de l'EAE chez la souris, la polyarthrite rhumatoïde, caractérisée par une inflammation chronique des articulations, et le modèle murin d'arthrite induite par le collagène (CIA pour « Collagen-Induced Arthritis) semblent faire intervenir les mêmes cellules effectrices productrices d'IL-17 dans le développement de la pathologie. Chez les patients souffrant de cette maladie auto-immune, les cellules Th17 sont de puissants activateurs des fibroblastes synoviaux, via l'augmentation de la production d'IL-6 et d'IL-8, et via l'augmentation de médiateurs de la dégradation des cartilages, les métalloprotéases de la matrice (MMP) (Van Hamburg et al. 2011). En accord avec ces données, les souris déficientes pour la cytokine pro-inflammatoire IL-23 ne développent aucun signe de la maladie, ce qui est corrélé avec l'absence de cellules Th17 et des cytokines IL-17 et TNF- α (Murphy et al. 2003).

Association avec l'interleukine 22

Agissant souvent de concert avec l'IL17, l'IL-22 est une cytokine se liant au récepteur dimérique composé des chaînes IL10R2 (ubiquitaire) et IL-22R1 (restreint à certaines cellules non hématopoïétiques uniquement), et est exprimée notamment par les cellules épithéliales des tractus respiratoire et digestif et au niveau des kératinocytes de l'épiderme et du derme (Trifari et al. 2009). La liaison de l'IL-22 à son récepteur active une voie de transduction du signal de type JAK/STAT3 et permet ainsi d'augmenter les mécanismes innés de défense épithéliale, notamment par la production de protéines anti-microbiennes comme les β -défensines. Globalement l'IL-22 permet une meilleure protection des tissus contre les lésions et autres agressions de pathogènes et déclenche la régénération tissulaire (Wolk et al. 2010), ceci au niveau de la peau, des poumons et des intestins (Kolls 2010 ; Rubino et al. 2012). Cependant, en parallèle de ses effets sur la production de protéines anti-microbiennes, l'IL-22 réduit aussi l'expression de molécules associées à la différenciation cellulaire et régule l'expression de molécules connues pour augmenter la mobilité cellulaire, ce qui peut conduire à des désordres d'organisation structurale des différentes couches de l'épiderme, pouvant mener à des acanthoses (maladies caractérisées par un épaissement de la peau) comme les verrues ou le psoriasis, touchant 1 à 3% de la population mondiale (Boniface et al. 2005 ; Wolk et al. 2006).

Asthme allergique. Les analyses du sang périphérique de patients atteints d'asthme allergique montrent des quantités importantes de lymphocytes Th17 comparées aux analyses de sang périphérique de patients sains. De plus, les concentrations plasmatiques des cytokines IL-17 et IL-22 ont tendance à augmenter en corrélation avec la sévérité de la maladie (Zhao et al. 2010). De plus, les taux d'IL-17 sont accrus dans les tissus pulmonaires, dans les liquides de lavages broncho-alvéolaires et le mucus des voies respiratoires de patients asthmatiques (Ivanov et Linden. 2007). Ces données corrélient avec la présence de neutrophiles dans le mucus des voies respiratoires de patients dont la sévérité de la maladie est croissante (Bullens et al. 2006), et suggèrent que l'IL-17 contribue à l'accumulation locale de neutrophiles chez les patients asthmatiques et à la sévérité de cette maladie. Ces résultats sont en accord avec les études de modèles murins qui révèlent l'importance de l'IL-17 dans l'induction et la maintenance de l'asthme allergique (Finkelman et al. 2010). Bien

qu'une corrélation positive ait été trouvée entre la quantité d'ARN messager de l'IL-22 et les taux d'IgE du sérum total chez les patients asthmatiques enfants (Farfariello et al. 2011), le rôle de cette cytokine dans l'asthme allergique reste flou, même dans le modèle murin, dans lequel l'IL-22 semble être requis pour l'établissement de la maladie, mais fonctionnerait comme régulateur négatif une fois l'inflammation des voies aériennes mise en place (Besnard et al. 2011).

Immunité intestinale. Les effets stimulants de l'IL-22 sur l'immunité innée sont aussi de grande importance au niveau des barrières mucosales intestinales. En effet les protéines anti-microbiennes comme les défensines, induites par l'IL-22, renforcent les jonctions serrées entre les entérocytes au niveau des intestins et induit la prolifération des cellules épithéliales (Sonnenberg et al. 2011). L'association de l'IL-17 et de l'IL-22 dans le système digestif permet une protection efficace contre certaines bactéries. Dans le cas de l'infection par *Citrobacter Rodentium*, pathogène extracellulaire, une forte réponse IL-17 est observée durant les 4 à 7 premiers jours après infection, puis durant les 10 à 14^{èmes} jours, permettant la prévention de la colonisation du caecum et du colon par la bactérie grâce au recrutement et à l'activation de neutrophiles au niveau de l'infection (Geddes et al. 2011). En parallèle, l'IL-22 va provoquer la sécrétion d'une protéine aux propriétés anti-microbiennes, RegIII γ , qui va alors médier les fonctions de protection contre *C. Rodentium* (Zheng et al. 2008). Par ailleurs, les souris déficientes en IL-6 ou en IL-23, deux cytokines inflammatoires induisant des réponses immunes de type IL-17 et IL-22, montrent une susceptibilité accrue à l'infection par *C. Rodentium*, et, dans le modèle de colite induite par *S. Typhimurium*, pathogène intracellulaire, les mêmes souris déficientes montrent un défaut important dans la protection de l'hôte contre la maladie (Geddes et al. 2011 ; Godinez et al. 2009). En effet, les lymphocytes Th17 dits innés, dans le cas de l'infection par *C. Rodentium*, et les lymphocytes Th17 et $\gamma\delta$, dans le cas de la colite induite par *S. Typhimurium*, ne sont pas activés par les cytokines pro-inflammatoires IL-6 ou IL-23, et ne produisent plus d'IL-17 et d'IL-22 nécessaires au recrutement et à l'activation des neutrophiles et à l'induction de la production de protéines anti-microbiennes indispensables pour le contrôle de l'infection (Figure 14).

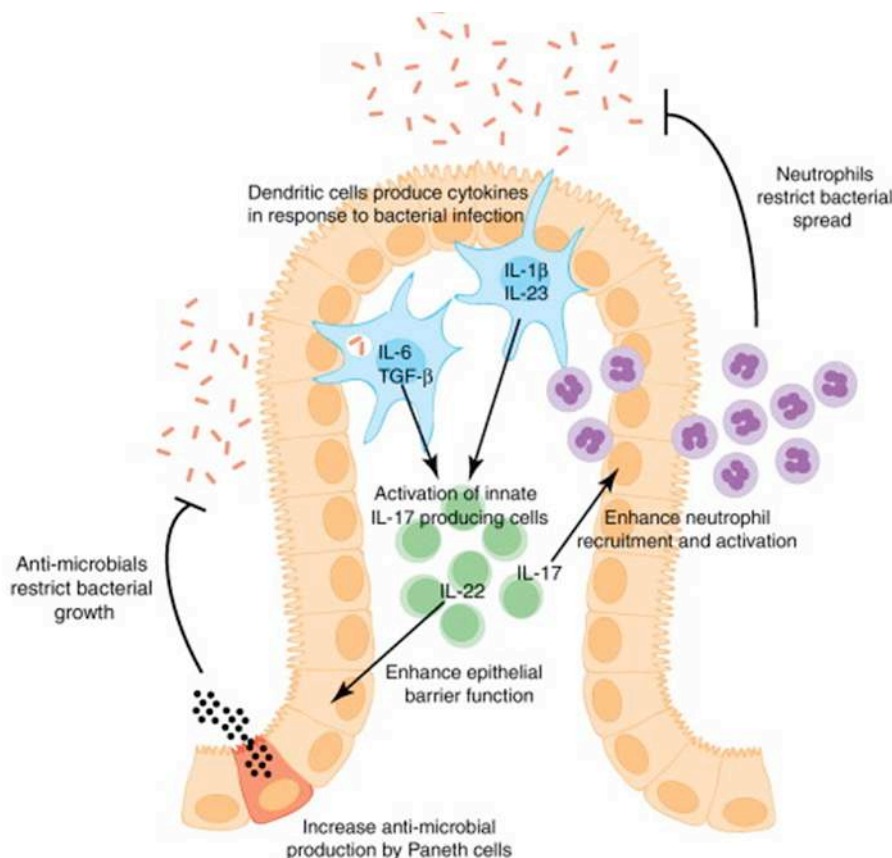


Figure 14 : Modèles d'action des cytokines IL-17 et IL-22 en réponse à des infections bactériennes intestinales. Les cellules dendritiques vont répondre à l'infection par des bactéries extracellulaires ou intracellulaires en produisant de l'IL-6, du TGF-β, de l'IL-1β et de l'IL-23. Ces cytokines vont promouvoir la production d'IL-17 et d'IL-22 par les lymphocytes innés. L'IL-17 va induire le recrutement et l'activation de neutrophiles alors que l'IL-22 va induire la production de protéines anti-microbiennes par les cellules de Paneth. (Figure extraite de Rubino et al. 2012)

D'autre part, dans les maladies inflammatoires de type IBD, en parallèle des effets délétères de l'IL-17 dans l'inflammation et dans les mécanismes de régénération tissulaire, l'expression de l'IL-22 est également augmentée et les taux d'IL-22 semble corrélés avec la sévérité de la maladie (Andoh et al. 2005 ; Brand et al. 2006 ; Schmechel et al. 2008). Par ailleurs, plusieurs modèles murins de maladie inflammatoire de l'intestin suggèrent que l'IL-22 exerce des fonctions protectrices dans les pathologies de type IBD, en déclenchant les mécanismes de défense de la part des cellules épithéliales et la régénération de la barrière muqueuse (Pickert et al. 2009 ; Sugimoto et al. 2008 ; Zenewicz et al. 2008), contrecarrant ainsi les effets délétères de l'IL-17.

Cellules Productrices d'IL-22

A l'origine, l'IL-22 a été décrite comme une cytokine produite par les lymphocytes T, notamment par les lymphocytes Th1 (Wolk et al. 2002), puis plus tard par les lymphocytes Th17 (Liang et al. 2006 ; Chung et al. 2006). Contrairement à l'IL-17 qui requiert l'IL-6 et le TGF- β (Veldhoen et al. 2006 ; Mangan et al. 2006), l'induction de l'IL-22 n'est dépendante que de l'IL-6, alors que le TGF- β induit l'expression du facteur de transcription c-Maf, qui va se lier au promoteur *il22* et inhiber son expression (Zheng et al. 2007 ; Rutz et al. 2011). Depuis, d'autres cellules T ont été décrites comme capables de produire de l'IL-22, les LT CD8^{pos}, les LT $\gamma\delta$ et les lymphocytes iNKT, sous le contrôle de l'interleukine 23 (Ciric et al. 2009 ; Sutton et al. 2009 ; Goto et al. 2009). Cependant la source la plus importante d'IL-22 est constituée par des sous-populations de cellules NK aux propriétés cytotoxiques limitées (Luci et al. 2009), également appelée « NK-like », et des cellules « LTi-like » (pour « Lymphoid tissue inducer ») (Takatori et al. 2009), fortement représentées au niveau des intestins (Colonna et al. 2009). Les cellules NK productrices d'IL-22 expriment les marqueurs CD127 et NKp46, le facteur de transcription ROR γ t, et sont NK1.1^{pos} ou NK1.1^{neg}, elles ne produisent pas d'IL-17 et sont dépendantes du microbiote intestinal (Luci et al. 2009 ; Cella et al. 2009 ; Satoh-Takayama et al. 2008). Ainsi les effets protecteurs de l'IL-22 lors d'une infection par *Citrobacter Rodentium* et lors d'une maladie chronique inflammatoire du type IBD, sont certainement dus à la présence de ces cellules NK NKp46⁺ ROR γ t⁺ (Zenewicz et al. 2008 ; Zheng et al. 2008). Les cellules « LTi-like », quant à elles, expriment également le facteur de transcription ROR γ t et expriment constitutivement le récepteur de l'IL-23, le récepteur aryl hydrocarbène (AhR) et le récepteur CCR6, médiateur de l'attraction vers les muqueuses, et peuvent, contrairement aux cellules « NK-like », produire simultanément l'IL-17 et l'IL-22 (Takatori et al. 2009). Ces cellules sont connues pour leur implication dans le développement des tissus lymphoïdes, mais elles sont également impliquées dans les défenses de l'hôte contre *Citrobacter Rodentium* via leur production rapide d'IL-17 et d'IL-22 (Sonnenberg et al. 2011). De plus, il a été montré que, dans le modèle de colite induite par DSS (« Dextran Sulfate Sodium »), les cellules CD11c⁺ peuvent produire de l'IL-22 et s'accumulent au niveau du colon, suggérant que ces cellules soient des cellules dendritiques, malgré le fait que

certaines cellules NK peuvent elles aussi exprimer le marqueur CD11c (Pickert et al. 2009 ; Zheng et al. 2008).

Chez l'Homme, le panel de cellules produisant l'interleukine 22 est relativement similaire à celui de la souris. Toutefois, il a été décrit une population T CD4^{pos} particulière produisant de l'IL-22 mais ne produisant ni IL-17 ni IFN- γ , les lymphocytes Th22. Ces cellules sont fortement représentées au niveau de la peau, et leur différenciation nécessite l'IL-6 mais pas le TGF- β , à l'instar de la souris (Zheng et al. 2007 ; Duhon et al. 2009).

IL-17 : Cible thérapeutique ?

Etant donnés les rôles pathogéniques conférés à l'IL-17, différents essais cliniques visant à inhiber le développement des lymphocytes Th17 ou à neutraliser directement l'IL-17 ou son récepteur ont été lancés. Très récemment deux équipes travaillant sur le traitement du psoriasis ont publié des résultats très prometteurs. L'une a développé un anticorps anti-IL-17 (Ixekizumab) et l'autre équipe a, quant à elle, développé un anticorps dirigé contre le récepteur de l'IL-17 (Brodalumab), bloquant tous deux l'action pro-inflammatoire de l'IL-17. Les injections par voie sous-cutanée de ces anticorps à des patients psoriatiques ont, dans les deux cas, entraîné une diminution de 75% en moyenne de la surface des plaques psoriatiques ainsi que de la sévérité des lésions (Leonardi et al. 2012 ; Papp et al. 2012). Des essais cliniques à partir des mêmes anticorps neutralisants l'IL-17 ou son récepteur sur des patients atteints de sclérose en plaques ont, de la même manière, apporté des résultats très encourageants pour le traitement de la maladie (Zhu et Qian. 2012). Dans le cas de la polyarthrite rhumatoïde et de la maladie de Crohn, des anticorps monoclonaux anti-IL-6-récepteur ou un antagoniste du récepteur de l'IL-1 β ont constitué une approche très intéressante (Geyer et Muller-Ladner. 2010 ; Patel et Moreland. 2010). Même si les mécanismes d'actions précis de ces molécules ne sont pas connus, il est possible que les effets thérapeutiques observés soient dus, en partie, à l'inhibition de la différenciation des lymphocytes Th17. Plus récemment, un inhibiteur de la voie de signalisation NF- κ B a été utilisé comme traitement des maladies inflammatoires intestinales (Funakoshi et al. 2012). L'inhibition de cette voie de signalisation entraîne une réduction de l'expression des ARN

messagers de nombreuses cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-17, mais aussi l'IL-1 β , l'IL-6 ou le TNF- α , et réduit de ce fait les symptômes de la maladie. Ainsi, les ciblage de l'IL-17, du récepteur de l'IL-17, de la voie de signalisation induisant la production de l'IL-17 ou encore la voie de signalisation médiée par l'IL-17 peuvent être considérés comme des moyens de traitement thérapeutiques de différentes maladies auto-immunes.

III – Lymphocytes Th17

En 1986, Mosmann et Coffman ont mis en évidence l'existence de deux sous-populations de cellules T effectrices, la première est capable de produire de l'IFN- γ et est dénommée cellules Th1. La deuxième est capable de produire de l'IL-4 et est dénommée cellules Th2 (Mosmann et al. 1986). Depuis, il a clairement été démontré que la différenciation vers l'une ou l'autre de ces sous-populations est déterminée par les facteurs de transcription qu'elles expriment. L'induction de ces facteurs est elle-même dépendante des cytokines présentes dans le micro-environnement après la stimulation des cellules T naïves par les CPA. Une fois différenciée, chaque sous-population sécrète un panel précis de cytokines effectrices et a une fonction bien distincte dans le système immunitaire. Les cellules Th1 sont essentielles pour la clairance des bactéries et des virus intracellulaires, cependant, lorsqu'elles sont dysrégulées, elles peuvent avoir des rôles pathogéniques dans plusieurs maladies auto-immunes (Szabo et al. 2003 ; Trinchieri. 2003). La différenciation des cellules Th1 est induite par l'IL-12, majoritairement produite par les cellules dendritiques et les monocytes, et l'IFN- γ , sécrété par les cellules Th1 déjà différenciées, les cellules NK et iNKT conventionnelles (Hsieh et al. 1993 ; Manetti et al. 1993 ; Lighvani et al. 2001). L'IFN- γ active STAT1, dont la signalisation va permettre l'induction de T-bet (T-box transcription factor TBX21) (Afkarian et al. 2002), qui est le facteur de transcription principal de la lignée cellulaire Th1 (Mullen et al. 2001 ; Szabo et al. 2000). T-bet induit l'expression du gène codant pour l'IFN- γ et régule positivement la transcription de la chaîne β du récepteur de l'IL-12 (IL-12R β 2), la fixation de l'IL-12 sur ce récepteur active la voie de signalisation dépendante de STAT4 et permet ainsi

la production d'IFN- γ par la cellule Th1 (Kaplan et al. 1996b ; Thierfelder et al. 1996). Le facteur de transcription GATA-3 régulant la différenciation des cellules Th2 est, quant à lui, activé par la signalisation induite par le récepteur de l'IL-4 et STAT6, l'IL-4 pouvant provenir des mastocytes, des basophiles, des éosinophiles, des cellules iNKT ou encore d'autres cellules Th2 déjà différenciées (Takeda et al. 1996 ; Shimoda et al. 1996 ; Kaplan et al. 1996a). GATA-3 est un facteur capable d'auto-activer son expression et rend possible la production de cytokines par les cellules Th2. Ces lymphocytes Th2 peuvent sécréter de nombreuses cytokines, dont l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-13 ou encore l'IL-25 (aussi connue sous le nom IL-17E). Ils sont de ce fait impliqués dans les défenses contre les parasites, comme les helminthes, ou contre d'autres pathogènes extracellulaires (Paul et Zhu. 2010). Cependant, lorsque ces cellules sont dysrégulées, la réponse Th2 peut mener à l'apparition de maladies allergiques, notamment l'asthme allergique (Paul et Zhu. 2010).

Toutefois, les cytokines sécrétées par les lymphocytes Th1 et Th2 ne sont pas seulement déterminées par leurs fonctions effectrices en réponse à un pathogène, elles sont aussi impliquées dans une boucle autocrine conférant un moyen de régulation positive de la cellule productrice, promouvant ainsi son propre développement et son expansion (Amsen et al. 2009). Par ailleurs, ces cytokines peuvent inhiber les fonctions des autres populations T helper, c'est-à-dire que l'IFN- γ peut inhiber les fonctions effectrices des cellules Th2 et réciproquement l'IL-4 peut inhiber les cellules Th1 (Mosmann et al. 1986). Ces inhibitions mutuelles sont également médiées par les facteurs de transcription spécifiques de chaque lignée cellulaire. Le facteur de transcription T-bet, caractéristique des cellules Th1, inhibe le développement des cellules Th2 en se liant directement au facteur de transcription GATA-3, prévenant ainsi l'activation des gènes spécifiques des cellules Th2 (Hwang et al. 2005). De la même manière, GATA-3 est capable de réguler négativement l'expression de STAT4 indispensable au développement des cellules Th1, sans agir sur le deuxième facteur de transcription T-bet (Usui et al. 2003).

La dichotomie Th1/Th2 a récemment été complétée par une troisième population de lymphocytes T helper effecteur, les cellules Th17, dont le nom est basé sur une cytokine caractéristique, l'IL-17A ou plus simplement IL-17 (Harrington et al. 2005 ; Park et al. 2005) **(Figure 15).**

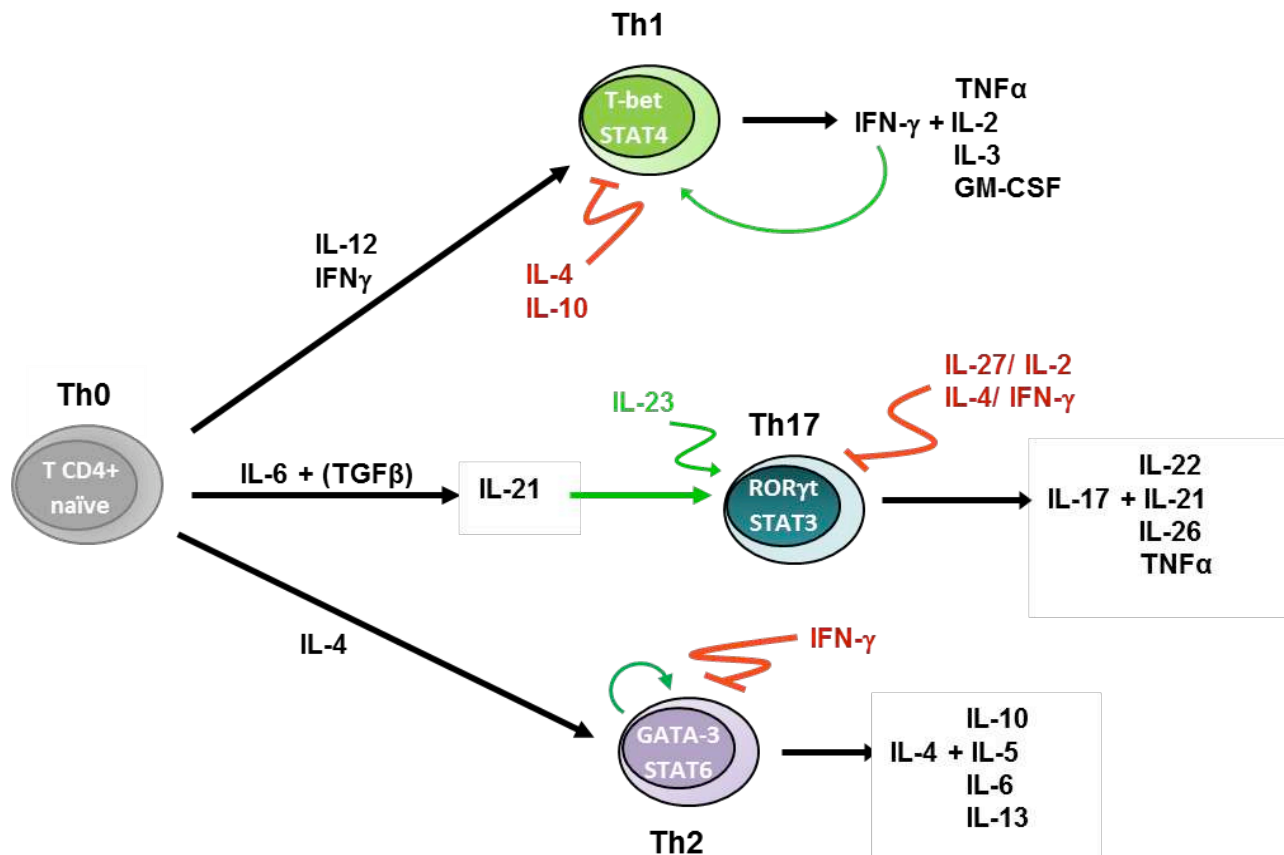


Figure 15 : Différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T helper et régulation croisée. La différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes Th1, Th2 ou Th17 dépend des facteurs de transcription activés par les cytokines du micro-environnement. Chaque population de cellules T sécrète alors des cytokines caractéristiques qui vont induire des mécanismes d'auto-régulation positive ou, au contraire, des mécanismes de régulation négative des autres populations de T helper.

Différenciation des lymphocytes Th17

En 2006, trois équipes distinctes ont découvert que l'association de l'IL-6 et du TGF- β (Transforming Growth Factor) induit la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes Th17 (Veldhoen M, et al. 2006 ; Bettelli et al. 2006 ; Mangan et al. 2006). L'implication du TGF- β a été une surprise car cette cytokine était surtout connue pour ses propriétés anti-inflammatoires et son rôle dans la différenciation des lymphocytes T régulateurs exprimant le facteur de transcription Foxp3. Cependant des études récentes ont

permis de montrer que le TGF- β n'est pas impliqué directement dans la différenciation de ces cellules, mais qu'il permet d'inhiber l'expression de STAT4 et de GATA-3, inhibant ainsi la différenciation des cellules Th1 et Th2 ce qui favorise alors le développement des cellules Th17 (Das et al. 2009). Cependant la génération de lymphocytes Th17 en absence de TGF- β conduit à un phénotype plus pathogénique et à la co-expression de T-bet et de ROR γ t par ces cellules (Ghoreschi et al. 2010). L'IL-6, par fixation sur son récepteur, active la voie de signalisation STAT3, qui va elle-même induire l'expression des facteurs de transcription clé pour la différenciation des lymphocytes Th17, ROR γ t et ROR α (Ivanov et al. 2006 ; Yang et al. 2008). L'activation de ROR γ t induit la transcription du gène *il17* codant pour l'interleukine 17 et permet l'expression du récepteur de l'IL-23, caractéristique des cellules Th17 (Ivanov et al. 2006 ; Zhou L, et al. 2007). L'IL-23 est une cytokine hétérodimérique composée des sous-unités p19 et p40, cette dernière étant commune avec l'IL-12 (Oppmann et al. 2000). Cependant, contrairement à l'IL-12, l'IL-23 n'induit pas la différenciation des cellules Th1, mais est important pour la survie, la maintenance de la lignée et l'expansion clonale des lymphocytes Th17 (Aggarwal et al. 2003 ; Veldhoen et al. 2006 ; McGeachy et Cua. 2008). IRF-4 (Interferon Regulatory Factory-4) est un facteur de transcription également impliqué dans la différenciation des lymphocytes Th17, il serait capable de co-opérer avec le facteur STAT3 pour l'induction de ROR γ t, de l'IL-17 et de l'IL-21 (Brustle et al. 2007 ; Biswas et al. 2010). L'IL-21 est une cytokine de la famille de l'IL-2 qui permet de promouvoir et/ou de maintenir la différenciation des lymphocytes Th17 de manière autocrine (Nurieva et al. 2007 ; Zhou et al. 2007).

Les cellules Th17 produisent alors de l'IL-17, contrôlée par le facteur ROR γ t, mais aussi de l'IL-6, de l'IL-22, de l'IL-21, de l'IL-26, du TNF- α ... La production d'IL-17 et l'expression du récepteur de l'IL-23 peuvent être amplifiées par la présence dans le micro-environnement de deux cytokines pro-inflammatoires : l'IL-1 β et le TNF- α (Veldhoen M, et al. 2006 ; Sutton et al. 2006).

Les fonctions effectrices des lymphocytes Th17 sont régulées négativement par l'IL-27 qui permet la phosphorylation et l'activation du facteur de transcription STAT1, inhibant les cellules Th17 (Stumhofer et al. 2006 ; Batten et al. 2006 ; Neufert C, et al. 2007) (**Figure 15**). De manière intéressante, l'IL-2, qui est connue pour être requise pour la survie des lymphocytes T en général, montre des fonctions inhibitrices sur les cellules Th17 (Laurence

et al. 2007), il en est de même pour les cytokines produites par les cellules Th1 et Th2, respectivement l'IFN- γ et l'IL-4 (Park et al. 2005). A l'instar des cytokines inhibitrices, on trouve également des récepteurs capables d'inhiber l'expression de gènes caractéristiques des cellules Th17 et, ainsi, leur différenciation. Par exemple, les récepteurs PPAR γ (Peroxisome-Proliferator-Activated Receptor) peuvent s'hétérodimériser avec des récepteurs de rétinoïdes, ce complexe va alors se lier aux domaines de réponse des PPAR γ et bloquer les régions promotrices des gènes *il23R*, *il21*, *il17* et *il17f* (Klotz et al. 2009), bloquant ainsi la différenciation des cellules Th17.

De plus, il semble à présent évidemment que les populations de cellules T helper sont plus nombreuses et plus variées. Ainsi, il a été proposé qu'une population de cellules T productrices d'IL-9, cytokine originellement décrite comme cytokine au profil Th2 impliquée dans les défenses contre les helminthes, composerait une sous-population de cellules T helper appelée Th9 (Dardalhon et al. 2009 ; Veldhoen et al. 2008). De même, il a été suggéré l'existence d'une population distincte des lymphocytes Th17, les lymphocytes Th22, capables de produire de l'IL-22 sans produire de l'IL-17, cependant ces données ne sont valables que dans le modèle humain mais n'ont pas été clairement démontrées dans le modèle murin (Duhon et al. 2009 ; Trifari et al. 2009). En effet, chez la souris, l'expression du facteur de transcription ROR γ t conduit à la production d'IL-17 et d'IL-22, alors que chez l'Homme, seule l'IL-17 est induite. De plus, il a été décrit que les lymphocytes Th22 expriment le récepteur Aryl Hydrocarbène (AhR) en complément du facteur de transcription STAT3, et que ce récepteur joue un rôle important dans la production d'IL-22 par ces cellules (Trifari et al. 2009) (**Figure 16**).

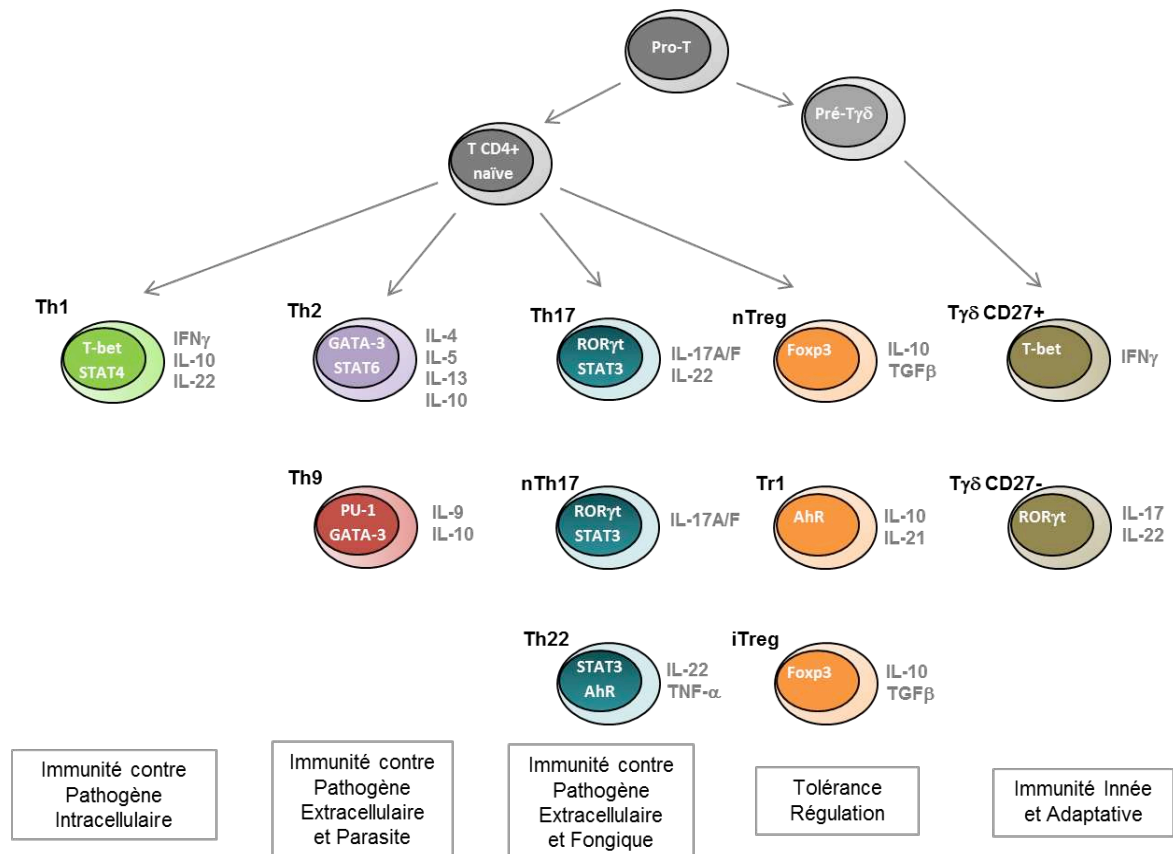


Figure 16 : Diversité des lymphocytes T. La cellule précurseur pro-T est à l'origine d'une diversité de lymphocytes T ayant des fonctions très diverses dans le système immunitaire. Selon les stimulations de l'environnement, elle va se différencier en différents lymphocytes T de type helper avec des profils cytokiniques très particuliers, ou en lymphocytes T régulateurs, eux-mêmes subdivisés en trois sous-populations, ou encore en lymphocytes T $\gamma\delta$, à l'interface entre l'immunité innée et adaptative (Adapté de Rutz et al. 2011)

Fonctions des lymphocytes Th17

Les lymphocytes Th17 sont impliqués dans différents aspects de l'immunité, notamment dans le maintien de la flore intestinale, dans le contrôle de l'immunité mucoale, et ils jouent un rôle protecteur fondamental dans les infections fongiques (*Candida* et *Aspergillus sp*) (Ivanov II, et al. 2007) et bactériennes (*C. Rodentium* et *S. Typhinurium*), de par leur production massive d'IL-17, comme nous l'avons décrit précédemment.

Le tractus intestinal est un organe unique et très particulier car il requiert une interaction constante avec une communauté complexe de bactéries résidentes de l'hôte, appelée

microbiote intestinal. Pour exemple, le microbiote intestinal est indispensable pour l'assimilation de certains nutriments, comme le glucose et les acides aminés, et de vitamines, comme la vitamine A, nécessaire au bon fonctionnement du système immunitaire, et notamment pour l'activation complète des lymphocytes T (une déficience en tryptophane, arginine, glutamine et cystéine réduit l'activation des lymphocytes T) (Fox et al. 2005). Le microbiote permet une certaine prévention de la colonisation de bactéries pathogènes pour l'hôte, et enfin, il promeut le développement des structures d'organes lymphoïdes comme les plaques de Peyer et les follicules lymphoïdes intestinaux (Kau et al. 2011). Récemment, des études sur des souris axéniques, c'est-à-dire élevées sans flore intestinale, ont démontré que la présence d'un microbiote intestinal complexe est nécessaire pour le développement des lymphocytes Th17 au niveau de la lamina propria (Ivanov et al. 2008), tissu conjonctif tapissant les muqueuses dont la muqueuse intestinale, et pour la génération d'une balance équilibrée entre lymphocytes Th17 $ROR\gamma^t^+$ et lymphocytes T $ROR\gamma^t^+Foxp3^+$ (Lochner et al. 2011). La dépendance des lymphocytes Th17 pour le microbiote intestinal réside dans le fait que la flore stimule la production de cytokines pro-inflammatoires, dont l'IL-1 β et l'IL-6, par les macrophages et les cellules dendritiques résidentes de l'intestin via la voie de signalisation TLR/MyD88 (Shaw et al. 2012 ; Hu et al. 2011). De manière intéressante, outre leur défaut en lymphocytes Th17, les souris axéniques montrent une accumulation des lymphocytes iNKT dans la lamina propria intestinale et dans les poumons, ce qui résulte en une aggravation des symptômes dans les modèles expérimentaux d'IBD ou d'asthme allergique comparativement aux souris élevées dans un environnement exempt de pathogènes spécifiques (Olszak et al. 2012). Ces données suggèrent que l'exposition précoce aux pathogènes microbiens influence sur le long terme les fonctions des cellules iNKT et diminuerait ainsi les réponses auto-inflammatoires de ces cellules.

Lymphocytes Th17 naturels

Depuis maintenant quelques années, plusieurs équipes se sont penchées sur l'existence d'une population lymphocytaire parallèle, mais relativement similaires aux lymphocytes Th17 tels que nous les connaissons. Ainsi, il a été démontré qu'une population de thymocytes simple positifs (SP) CD4^{pos} est capable de produire de l'IL-17, et que ces cellules sont générées au niveau du thymus (Marks, et al. 2009 ; Tanaka et al. 2009 ; Kim et al. 2011), ces cellules sont également des cellules Th17 «mémoires-like». Ces cellules ont été nommées lymphocytes Th17 naturels, de par leur différenciation intra-thymique, et l'idée a été exclue que ce puissent être des lymphocytes Th17 dits conventionnels ou induits ayant recolonisé le thymus. Les données suggèrent ainsi plutôt que la population Th17 en son entier serait comparable à celle des lymphocytes T régulateurs, c'est-à-dire qu'elle est divisée, au minimum, en deux sous-populations, à savoir les cellules naturelles (nTreg ou nTh17) présentes et fonctionnelles dès le thymus et les cellules induites (iTreg ou iTh17) différenciées au niveau de la périphérie.

Développement

Les cellules nTh17 sont définies comme des cellules auto-réactives, sélectionnées par des antigènes du soi, ce qui les rend comparables aux cellules iNKT et aux cellules T $\gamma\delta$. La sélection positive est dépendante d'une forte réactivité aux antigènes du soi présentés par un complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II exprimé par des cellules épithéliales médullaires plutôt que par des cellules épithéliales corticales, comme c'est le cas pour les lymphocytes Th17 induits (Kim et al. 2011). Ces résultats suggèrent ainsi l'existence de deux mécanismes bien distincts de sélection conduisant l'une des branches à devenir des cellules dites naturelles. Cependant cela mène à des questions ouvertes sur les mécanismes de différenciation intra-thymiques vers le phénotype Th17, et pose la question de l'existence d'autres populations naturelles équivalentes aux lymphocytes Th1 et/ou Th2.

Le développement des lymphocytes nTh17 montre une ressemblance importante avec celui des lymphocytes nTreg alors que leurs propriétés effectrices les rapprocheraient plus des lymphocytes T effecteurs non conventionnels, comme les cellules iNKT et T $\gamma\delta$. En effet,

l'ontogénie des lymphocytes nTh17 semble être indépendante de la présence d'IL-6 et /ou de STAT3 puisqu'ils se développent chez les souris déficientes pour l'un ou l'autre de ces facteurs (Tanaka et al. 2009), contrairement aux lymphocytes Th17 induits qui ne peuvent se développer chez ces souris. Cependant, il est clairement décrit que ces cellules expriment le facteur de transcription ROR γ t, contrôlant lui-même la production d'IL-17, mais de manière intéressante, la production d'IL-17 n'est pas accompagnée d'une production d'IL-17F, comme c'est le cas pour les lymphocytes Th17 induits.

Propriétés fonctionnelles

Très peu d'articles relatent l'existence des lymphocytes Th17 naturels, de cela découle une faible connaissance des rôles fonctionnels qu'elles peuvent avoir au cours d'infections ou de diverses inflammations. Toutefois, ces lymphocytes nTh17 produisent de grandes quantités d'IL-17 et il a été montré qu'ils jouent un rôle critique dans le recrutement de neutrophiles et de macrophages au niveau des sites inflammatoires des voies aériennes à partir d'un modèle d'hypersensibilité à l'OVA. (Tanaka et al. 2009). En effet, les souris RAG^{-/-}, déficientes en lymphocytes T et B, montrent un défaut de recrutement des neutrophiles et des macrophages en réponse à une sensibilisation par l'OVA, or l'injection de lymphocytes nTh17 à ces souris suffit à restaurer la réponse inflammatoire et le recrutement cellulaire.

L'existence de deux lignages cellulaires T parallèles, les cellules naturelles et les cellules induites, pourrait suggérer un nouveau paradigme qui définirait des mécanismes inhérents impliquant des cellules auto-réactives, exprimant des TCRs réarrangés donc fonctionnels, ayant la capacité d'assister le système immunitaire inné dans les réponses de l'hôte à travers la reconnaissance d'antigènes du soi, et servir une fonction non redondante dans la clairance des pathogènes et/ou dans la régulation des lésions inflammatoires.

OBJECTIFS

Plusieurs populations lymphocytaires T se développent dans le thymus, notamment certaines populations naturelles comme les lymphocytes iNKT, les lymphocytes $T\gamma\delta$ et les lymphocytes Th17 naturels récemment décrits. Ces cellules ont pour particularité d'être fonctionnelles au niveau du thymus, et produisent notamment de l'IL-17. Nous avons choisi d'approfondir les connaissances sur ces cellules, les lymphocytes iNKT17 et les lymphocytes nTh17 notamment par l'étude de leur développement et de leurs propriétés fonctionnelles.

I – La protéine adaptatrice SAP joue-t-elle un rôle dans le développement des lymphocytes iNKT producteurs d'IL-17 ?

La protéine adaptatrice SAP est indispensable au développement des lymphocytes iNKT et régule l'acquisition des capacités de production d'IL-4 et d'IFN- γ . Notre laboratoire ayant révélé l'existence des lymphocytes iNKT $ROR\gamma^{\text{pos}}$ producteurs d'IL-17, nous nous sommes intéressés au rôle potentiel de SAP dans la différenciation et/ou dans l'acquisition des propriétés fonctionnelles des lymphocytes iNKT17.

II – Quelles sont les propriétés fonctionnelles des lymphocytes T $ROR\gamma^{\text{pos}}$ matures identifiés dans le thymus ?

Nos études sur les lymphocytes iNKT17 nous ont permis de détecter une population lymphocytaire T mature et fonctionnelle au niveau du thymus. Plusieurs rapports récents ont également décrit une sous-population naturelle des lymphocytes Th17 producteurs d'IL-17, dont le développement diffère de celui des lymphocytes Th17 induits. Nous nous sommes donc proposé de poursuivre l'étude de ces cellules naturelles et d'étudier leur capacité à produire de l'IL-17 et de l'IL-22, ainsi que les antigènes et stimuli susceptibles de les activer.

MATERIELS ET METHODES

I - Expérimentations animales

Animaux : Des souris mâles C57Bl/6J sauvages, C57Bl/6J J α 18^{-/-} (déficientes en cellules iNKT), Rag^{-/-} Ly5.1 âgées de six à huit semaines sont élevées dans l'animalerie du CNRS UMR 8147, dans un environnement exempt de pathogènes spécifiques, avec libre accès à l'eau et à la nourriture. Les souris Rorc(γ t)-Gfp^{tg} et IL-6^{-/-} Rorc(γ t)-Gfp^{tg} ont été données par Gérard Eberl de l'Institut Pasteur de Paris. Les souris Sap^{-/-} V α 14-Tg, Sap^{+/+} V α 14-Tg, Sap^{-/-} V α 14^{TG} rorc(γ t)-Egfp^{TG} et Sap^{+/+} V α 14^{TG} rorc(γ t)-Egfp^{TG} ont été obtenues grâce à notre collaboration avec Sylvain Latour (INSERM U768, Hôpital Necker, Paris). Les souris Germ-free Rorc(γ t)-Gfp^{tg} (Institut Pasteur de Paris) sont obtenues à partir d'une colonie exempte de pathogène spécifique (SPF) par césarienne suivie d'une adoption des bébés par des mères germ-free. Les expériences ont été réalisées avec l'accord du Comité Institutionnel Français.

Injection intraveineuse : Pour déterminer l'effet du LPS sur les lymphocytes iNKT, T CD4^{pos} et T γ δ in vivo, nous avons injecté par voie intraveineuse rétro-orbitale 25 μ g de LPS (K235, Sigma-aldrich) par souris ou de la solution saline. Après 3h, les ganglions périphériques (inguinaux, axillaires, mésentériques et médiastinaux) ont été récupérés puis préparés en RPMI complet (RPMI 1640 + 10% SVF + 1% Pénicilline/Streptomycine + 1% Glutamine + 1/1000 β -Mercaptoéthanol + 1% Hepes) pour une stimulation.

Transfert adoptif des cellules T CD4^{pos} CD44^{low} : Les cellules CD4^{pos} CD44^{low} isolées à partir des cellules spléniques de souris C57Bl/6J sauvages Ly5.2 sont injectées par voie rétro-orbitale à des souris receveuses Rag^{-/-} Ly5.1. Les lymphocytes T CD4^{pos} naïfs ont été enrichis par déplétion des cellules CD8^{pos} et CD19^{pos} à l'aide de billes magnétiques (voir ci-après). Une fois les cellules enrichies, elles sont alors triées électroniquement après marquage de surface (TT-CD1d-APC, CD4-APC-H7, CD8-PB, CD44-PECy7) (voir ci-après). Un total de 3 x 10⁶ cellules en 150ul sont injectées aux souris receveuses. Après 10 jours, les thymus, rate et ganglions périphériques (inguinaux, axillaires, mésentériques et médiastinaux) sont collectés. Les suspensions cellulaires sont alors stimulées en présence d'un surnageant de BMDCs (voir ci-après) ou en présence d'anti-CD3 et d'anti-CD28 (voir ci-après). Les cellules sont ensuite marquées en surface et en intracellulaire pour regarder la production d'IL-17 et d'IL-22. Les cellules transférées et les cellules des souris receveuses sont distinguées grâce au marqueur Ly5.1 (CD45.1) uniquement présent sur les cellules des souris receveuses.

Préparation des suspensions cellulaires : Le thymus, la rate, le foie et les ganglions périphériques (inguinaux, axillaires, mésentériques et médiastinaux) sont broyés dans une solution de PBS 2% SVF (PBS 1X + 2% SVF + 1% Pénicilline et Streptomycine) puis centrifugés (5 min, 1200 rpm, 4°C). Le culot de cellules hépatiques est resuspendu dans 12 mL de percoll 35% (*Amersham Biosciences*) dilué dans du RPMI. La suspension obtenue est centrifugée 25 min à 2600 rpm à température ambiante, ce qui permettra de séparer les cellules d'intérêt des cellules graisseuses. Les culots de cellules spléniques et mononucléées du foie sont traités avec de l'ACK (Acétate de potassium) afin de lyser les globules rouges. Les différentes cellules sont ensuite remises en suspension dans le milieu adéquat et numérées en bleu Trypan.

Isolation des lymphocytes de la lamina propria : L'intestin grêle est prélevé sous l'estomac jusqu'au caecum, coupé en tronçons de 2 à 3 cm, vidé, coupé en deux dans la longueur et lavé en PBS1X. Les plaques de Peyer ont été retirées. Les cellules épithéliales sont supprimées par une succession d'agitations en PBS1X complémenté en EDTA (30mM). Les tissus restants sont digérés à 37°C dans un milieu DMEM additionné de collagénase IV (1mg/mL) et de DNase I (1U/mL), puis les lymphocytes de la lamina propria sont isolés par gradient de Percoll (40% / 80%). Les cellules sont ensuite stimulées en PMA-Ionomycine, en surnageant de LPS ou en anti-CD3 + anti-CD28) (voir ci-après).

II - Culture cellulaire

Activation des cellules iNKT *in vitro* : Les cellules iNKT sont mises en culture en présence de macrophages péritonéaux et d' α -GalCer (200 ng/ml) dans une plaque de culture (96 puits à fond plat) pendant 72h. Les macrophages servant de cellules présentatrices d'antigènes sont prélevés au niveau du péritoine de souris $J\alpha 18^{-/-}$ et sont mis au minimum 1h à 37°C afin d'adhérer au fond des puits. Les surnageants sont ensuite récupérés et stockés à -80°C jusqu'à la quantification cytokinique par ELISA.

Activation des lymphocytes T CD4^{pos} : Les cellules triées électroniquement (10^5 cellules par puits) sont mises en culture en RPMI complet et en présence d'anti-CD3 (1 μ g/mL) et d'anti-CD28 (1 μ g/mL) dans des plaques 96 puits à fond rond pendant 2 jours à 37°C. Les anticorps purifiés anti-CD3 et anti-CD28 ont préalablement été mis à adhérer dans la plaque pendant 1h. Les surnageants sont récupérés à J2 et stockés à -80°C en attendant le dosage des cytokines par ELISA.

Différenciation des lymphocytes Th17 : Les cellules T naïves triées (10^5 cellules/puits) sont mises en culture dans une plaque de culture 96 puits à fond rond en présence de différents stimulants : TGF β

(1 ng/mL), IL-6 (20 ng/mL), IL-1 β (10 ng/mL) et TNF α (10 ng/mL) pour les différencier en lymphocytes Th17. Toutes les cellules sont activées avec de l'anti-CD3 (1 μ g/mL) et de l'anti-CD28 (1 μ g/mL) fixés au fond des puits pendant 1h à 37°C. A J4, les cellules différenciées sont ensuite lavées, mises au repos pendant 1 journée en présence d'IL-2 (20 ng/mL) puis sont restimulées à J5 avec un anti-CD3 fixé sur plaque en présence ou non d'IL-23 (10 ng/mL) et d'IL-1 β (10 ng/mL).

Stimulation des cellules : Pour analyser la production cytokinique des différents lymphocytes d'intérêt, les suspensions cellulaires enrichies ou non sont stimulées pendant 4h en RPMI complet en présence de 10^{-8} M de PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate), de 10^{-6} M d'ionomycine et de 2 μ g/mL de bréfeldine A (tous provenant de Sigma-aldrich), additionné ou non d'IL-23 (10 ng/mL) et d'IL-1 β (10 ng/mL). Après 4h, les cellules sont lavées et resuspendues en milieu adéquat pour le marquage extracellulaire et intracellulaire.

Stimulation « LPS » : Les suspensions cellulaires d'intérêt sont incubées pendant 16h avec les surnageants de cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse (BMDCs) préalablement stimulées 6h avec du LPS (100 ng/mL) ou du milieu, ou avec des anticorps anti-CD3 + anti-CD28 (1 μ g/mL chacun) préalablement fixés en plaques 96 puits à fond rond comme contrôle. De la bréfeldine A (2 μ g/mL) est ajoutée durant les 3 dernières heures. Les BMDCs ont été obtenues après 6 jours de culture en présence de GM-CSF (2 ng/mL). Dans certaines expériences des anticorps bloquants anti-IL-23 et anti-IL-1 β (10 μ g/mL chacun ; eBioscience) ont été ajoutés aux surnageants des BMDCs. Les cellules sont ensuite lavées et resuspendues en PBS Fluo pour le marquage.

III - Analyse et tri par cytométrie en flux

Tétramère et anticorps : Pour la détection des cellules iNKT nous utilisons la technique du tétramère CD1d-PBS57 = TT = quatre molécules de CD1d biotinylées, associées à une molécule de PBS-57, analogue de l' α GalCer, et reliées par la Streptavidine elle-même couplée à un fluorochrome (APC ou PE). De manière générale, les anticorps utilisés sont : anti-CD4-APC-H7, anti-CD8-Pacific Blue ou V500 ou FITC, anti-CD44-PE-Cy7 ou FITC, anti-T γ δ -FITC ou PE, anti-TCR β -APC ou eFluor450, anti-Gfp-FITC, anti-IL-17-PerCPCy5.5 ou APC, anti-IL-22-PE ou PerCP eFluor710, anti-IL-4-PE ou PE-Cy7, anti-IFN γ -PE, anti-CD24-Pacific Blue (eBioscience ; BD Pharmingen ; R&D Systems).

Marquage extracellulaire : Le marquage des cellules est effectué dans du PBS 1X + 2% SVF + 1% de Pénicilline et Streptomycine et 0,01% d'Azide (PBS Fluo). 3 à 4x10⁶ de cellules sont marqués à leur surface avec différents anticorps et du tétramère de CD1d- α GC en présence d'un anti-CD16 non

marqué (24G2), servant à bloquer les récepteurs des fragments constants des immunoglobulines, pendant 30 minutes à 4°C et dans l'obscurité. Les cellules sont ensuite lavées avec du tampon Fluo puis elles peuvent être réincubées avec une autre série d'anticorps, ou resuspendues dans un tampon de fixation (PBS Fluo + 1% Formol) puis distribuées en tubes FACs de 5 mL pour l'analyse au cytomètre.

Marquage intracellulaire : Après le marquage extracellulaire, les cellules sont fixées 5 minutes à température ambiante avec du paraformaldéhyde 4% (PFA = PBS 1X + PFA, 40 mg/mL). Elles sont ensuite lavées et perméabilisées avec du PBS Saponine (PBS Fluo + Saponine 0,5%) puis incubées avec les anticorps préparés en PBS Saponine pour le marquage intracellulaire pendant 30 minutes à température ambiante à l'obscurité. Les cellules sont de nouveau lavées avec du PBS Saponine puis avec du PBS Fluo, pour être finalement resuspendues avec du tampon de fixation.

PLZF : Les suspensions cellulaires thymiques, ganglionnaires, spléniques et de la lamina propria sont marquées en surface comme décrit précédemment. Le marquage intracellulaire du facteur de transcription PLZF ou de l'isotype contrôle igG, sont réalisés avec le kit IntraPrep de Beckman Coulter, puis les cellules sont resuspendues dans un tampon de fixation (PBS Fluo + 1% Formol) avant passage au FACs.

Enrichissement cellulaire : Les cellules thymiques, spléniques et ganglionnaires sont enrichies en cellules iNKT, T CD4^{pos} et T γ δ par déplétion des cellules CD8^{pos} et/ou CD19^{pos} et/ou CD62L^{pos}. Les suspensions cellulaires sont incubées avec les anticorps purifiés correspondants pendant 30 minutes à 4°C, lavées puis incubées avec des billes magnétiques recouvertes d'immunoglobulines anti-rat (Bio-Adembeads, Ademtech) selon les recommandations du producteur. Les suspensions cellulaires sont alors passées sur un aimant qui va permettre d'éliminer les cellules ayant fixées les billes magnétiques. Les suspensions enrichies sont récupérées et resuspendues dans le milieu adéquat.

Tri électronique, acquisition et analyse : Les cellules ont été marquées en tampon PBS 2% SVF et leur concentration a été ajustée à 40.10⁶ cellules/mL pour le tri cellulaire. Après le tri les cellules ont été récupérées dans la même tampon. Les tris électroniques ont été effectués sur un FACS Aria II (BD Biosciences) de la plateforme de cytométrie de l'Institut de Recherche Necker Enfants Malades (IRNEM) grâce à Jérôme Mégret, Corinne Cordier-Garcia (IRNEM) et Séverine Diem (UMR 8147).

Pour l'analyse phénotypique et fonctionnelle des populations cellulaires d'intérêt, l'acquisition des données a été faite grâce à un FACSCanto II avec le logiciel FACSDiva (BD Biosciences) et les analyses réalisées avec le logiciel Flow Jo (Treestar).

IV - Quantification cytokinique par ELISA

Le dosage des cytokines IL-17, IL-22, IL-4 et IFN- γ se fait par la technique d'ELISA (« Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay ») selon les notices du producteur pour l'IL-4, l'IL-22, l'IL-17 (Kit Duoset, *R&D Systems*), et pour l'IFN- γ , nous utilisons des anticorps purifiés dans notre laboratoire (AN18 pour l'anticorps de capture, 2 pg/mL final ; R46A2 pour l'anticorps de détection, 1 μ g/mL final). Les anticorps de capture sont dilués au 1/1000^{ème} dans du PBS 1X puis sont fixés dans des plaques ELISA (50 μ L par puits) toute la nuit à 4°C à l'obscurité. Les étapes suivantes se dérouleront à température ambiante. Une saturation est ensuite faite, afin de bloquer les sites aspécifiques, avec du PBS-BSA (PBS 1X, BSA= Bovine Serum Albumine 1/100^{ème}) pendant 1h (50 μ L par puits). Trois lavages au PBS Tween (PBS 1X, Tween 1/100^{ème}) sont ensuite réalisés puis du PBS-BSA en quantité adéquate est ajouté dans chaque plaque. La gamme de cytokine est ensuite réalisée (IL-17 à 4 ng/mL, le reste à 2 ng/mL) avec dix dilutions au 1/2. Les surnageants d'intérêt sont disposés dans les puits des plaques avec quatre dilutions au 1/2 pour chaque échantillon. Après 1 à 2h d'incubation, trois lavages au PBS Tween sont effectués, puis les anticorps de détection, couplés à la biotine, sont dilués dans du PBS-BSA, déposés dans les plaques (50 μ L par puits) et laissés incuber pendant 1h. Les plaques sont de nouveau lavées trois fois avec du PBS Tween, puis la Streptavidine couplée à la peroxydase (100 ng/mL) est déposée chaque puits et est incubée 1h. Après trois derniers lavages au PBS Tween, l'OPD (Orthophénylènediamine, *SIGMAFAST*), substrat de la peroxydase, est ajouté (50 μ L par puits) pour la révélation, qui est ensuite arrêtée avec 25 μ L d'acide sulfurique (H₂SO₄) au 1/10^{ème}. Les plaques sont ensuite insérées dans un lecteur de microplaque (Molecular Devices) et les données récupérées via le logiciel SoftMax Pro, permettant également l'analyse des résultats.

RESULTATS

Comme nous l'avons décrit dans la partie « Objectifs de travail », nous nous sommes particulièrement intéressés aux cellules T productrices d'IL-17 en général, et, plus particulièrement, aux cellules iNKT17 (Article n°1) et aux lymphocytes Th17 naturels (Article n°2).

Article n°1 :

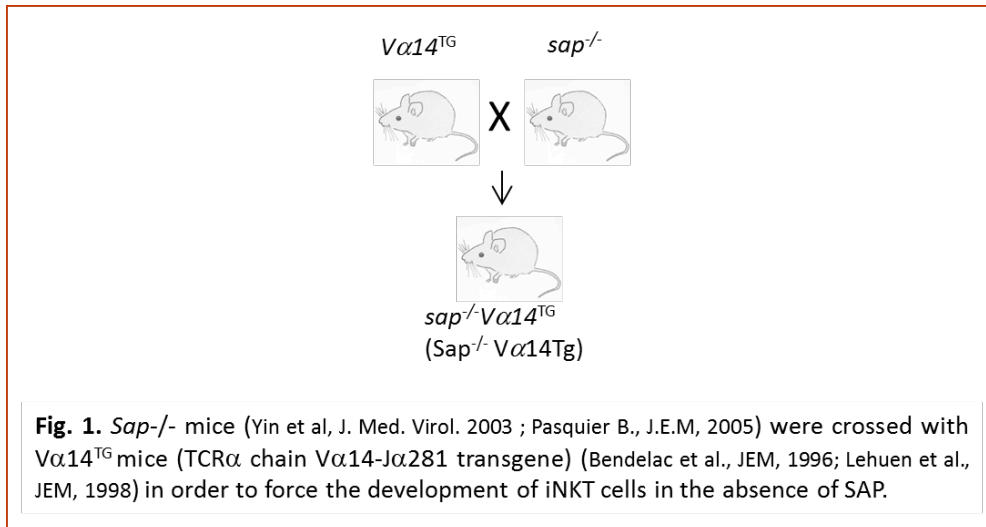
Implication différentielle de SAP dans les voies de différenciation des lymphocytes iNKT conventionnels et des lymphocytes iNKT17.

Latour S, Massot B, Lenoir C, Diem S, Pasquier B, Michel M-L, Sawa S, Lehuen A, Eberl G, Veillette A, et Leite-de-Moraes MC

(Article en préparation)

Les cellules Natural Killer T invariantes (iNKT) sont fonctionnellement divisées en deux sous-populations matures bien distinctes : les cellules iNKT ROR γ ^{neg} productrices d'IL-4 et les cellules iNKT ROR γ ^{pos} productrices d'IL-17 (Bendelac. 2007 ; Michel et al. 2007 et 2008). « SLAM-associated protein » (SAP) est une petite protéine adaptatrice s'associant à une famille d'immuno-récepteurs SLAM transducteurs de signal intracellulaire. SAP joue un rôle essentiel dans le développement des deux sous-populations de cellules iNKT puisque les déficiences en SAP chez la souris (Sap^{-/-}) et Xiap chez l'Homme entraîne l'absence de lymphocytes iNKT et une déficience de la réponse de type Th2 pour les souris Sap^{-/-} (Yin et al. 2003 ; Pasquier et al. 2005 ; Nichols et al. 2005). Sachant que les cellules iNKT acquièrent leur capacité à produire de l'IL-4 pendant leur développement thymique et que les souris SAP^{-/-} ont une déficience de la réponse Th2, nous nous sommes demandés si SAP est également impliqué dans l'acquisition de la capacité à produire de l'IL-4 par les cellules iNKT. Comme les souris SAP^{-/-} ne possèdent pas de cellules iNKT, nous avons croisé des souris déficientes en SAP avec des souris exprimant le transgène V α 14-J α 18 pour la chaîne α du TCR (V α 14-Tg) (Pasquier et al.

2005 ; Bendelac et al. 1996 ; Lehen et al. 1998) et avons obtenu des souris transgéniques V α 14 déficientes en SAP (souris Sap^{-/-} V α 14-Tg) (**Fig. 1**).



Ensuite, nous avons effectué une étude phénotypique de ces souris, dans le but de déterminer la fréquence des cellules iNKT dans les différents organes. Nous avons observé que ces souris transgéniques Sap^{+/+} V α 14-Tg et Sap^{-/-} V α 14-Tg développent des proportions significatives de cellules iNKT par rapport à des souris sauvages. Ces cellules sont présentes au niveau des organes lymphoïdes primaire (thymus) et secondaires (rate, ganglions et foie) similaires à celui des souris sauvages. Toutefois, les cellules iNKT sont plus représentées chez les souris Sap^{+/+} V α 14-Tg que chez les souris Sap^{-/-} V α 14-Tg (**Fig. 2**).

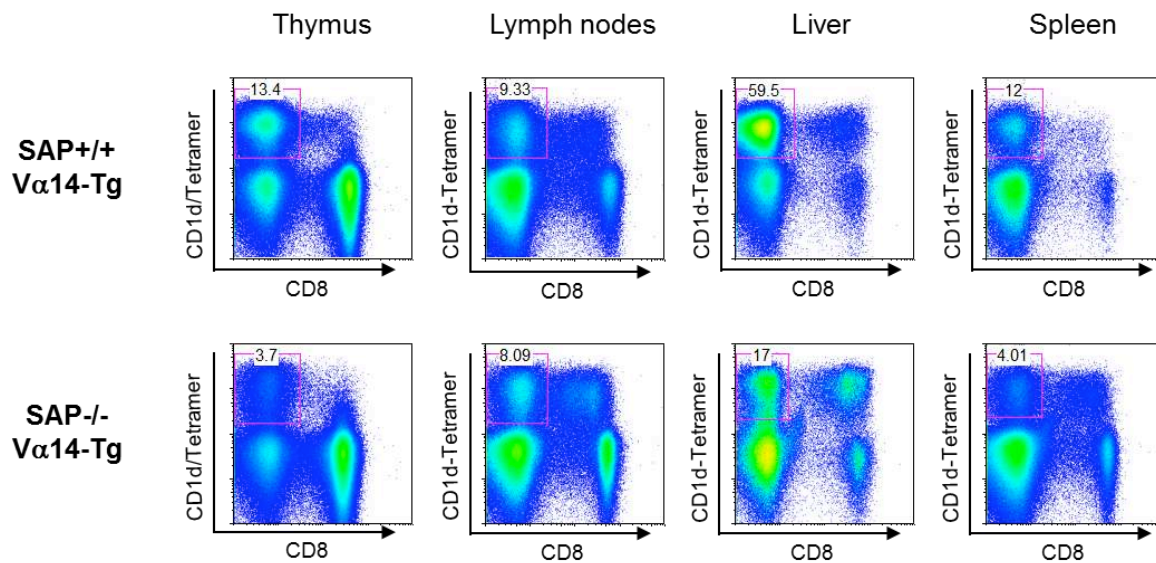


Fig. 2. Mononuclear cells from thymus, lymph nodes, liver and spleen of *Sap*^{-/-} Vα14Tg and *Sap*^{+/+} Vα14Tg mice were stained with CD1d/tetramers and anti-CD8. Representative FACS profile of CD1d/tetramers and CD8 expression. Data are representative of six independent experiments. Percentages of each subset are indicated in quadrants.

L'étape suivante a été de déterminer si les cellules iNKT des souris *Sap*^{-/-} Vα14-Tg et *Sap*^{+/+} Vα14-Tg étaient bien fonctionnelles et capables de sécréter des cytokines en réponse à une stimulation par l'α-GalCer. Ainsi les cultures en présence d'α-GalCer des cellules mononucléées des thymus, rate et foie des souris transgéniques produisent de l'IL-4, de l'IFN-γ et de l'IL-17 chez les souris *Sap*^{+/+} Vα14-Tg. Cependant, de manière très intéressante, les cellules iNKT des souris *Sap*^{-/-} Vα14-Tg ne sécrètent pas d'IL-4 mais produisent des taux significativement plus élevés d'IL-17 (**Fig. 3**). Cela suggère que SAP joue un rôle primordial dans l'acquisition de la capacité à sécréter de l'IL-4 par les cellules iNKT.

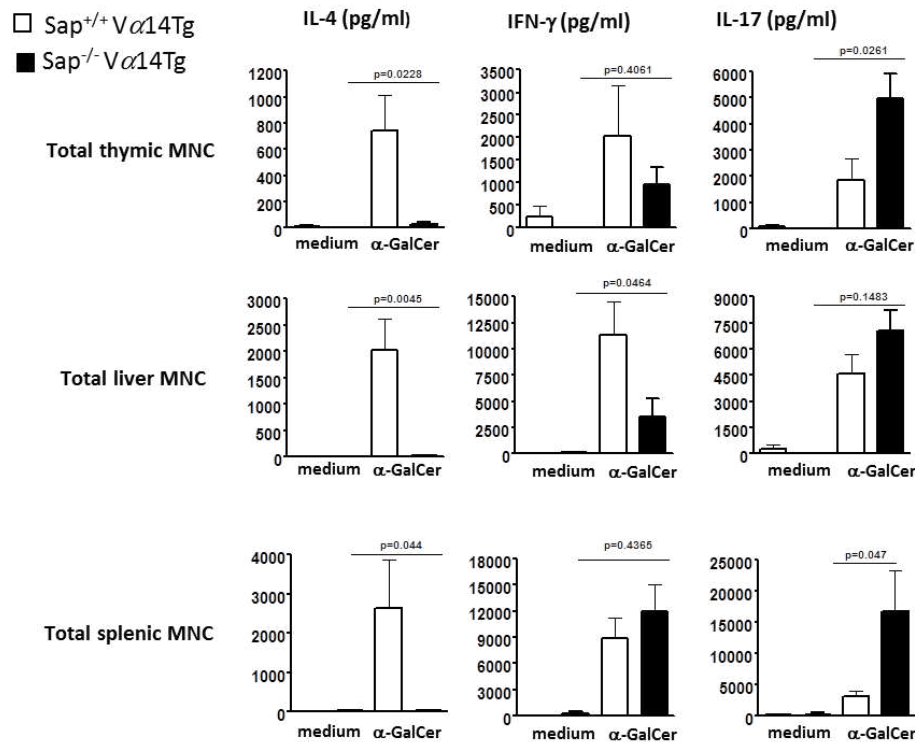


Fig. 3. Mononuclear cells from thymus, liver and spleen from Sap^{-/-} Vα14Tg (dark histograms) or Sap^{+/-} Vα14Tg (light histograms) mice were stimulated at 2×10^5 (liver and spleen) or 5×10^5 (thymus) cells per well with α-GalCer (100 ng/ml). Irradiated macrophages (2×10^5 per well) were added as APC for thymic cells. 72h later, supernatants were harvested and IL-17, IL-4 and IFN-γ were then measured by ELISA. Data represent the mean \pm s.e.m. of 6 to 9 individual.

Compte tenu que la fréquence et le phénotype fonctionnel des lymphocytes iNKT diffèrent entre les souris Sap^{-/-} Vα14-Tg et Sap^{+/-} Vα14-Tg, il était important d'effectuer une analyse plus approfondie de ces cellules et notamment de les trier électroniquement afin de mieux évaluer leur profil cytokinique. Pour écarter les lymphocytes iNKT les plus immatures, nous avons sélectionné les lymphocytes iNKT CD24^{neg} CD8^{neg}. Parmi ces thymocytes iNKT, nous avons observé une accumulation du stade CD44^{high} NK1.1^{neg} chez les souris Sap^{-/-} Vα14-Tg (**Fig. 4A**), correspondant au stade 2 immature. De même, cette population est augmentée dans la rate des souris Sap^{-/-} Vα14-Tg (**Fig. 4B**). Nous pouvons également observer une diminution de la fréquence des cellules iNKT CD4pos chez ces animaux (**Fig. 4A et B**). Ensuite, nous avons trié électroniquement les différents stades et sous-populations de cellules iNKT des souris Sap^{-/-} Vα14-Tg et Sap^{+/-} Vα14-Tg, à partir du thymus et de la rate et les avons stimulés en présence de macrophages et d'α-GalCer pendant 3 jours. Nous avons observé que les différents stades et sous-populations de cellules iNKT des souris Sap^{-/-} Vα14-Tg ne produisent pas d'IL-4 mais

des taux élevés d'IL-17 (**Fig. 4C et D**), confirmant les résultats obtenus avec les cellules non triées (**Fig. 3**). Ces résultats indiquent clairement que SAP est nécessaire à l'acquisition thymique de la capacité de production d'IL-4 par les cellules iNKT. SAP serait au contraire dispensable à l'acquisition de la capacité de production d'IL-17 par les lymphocytes iNKT17.

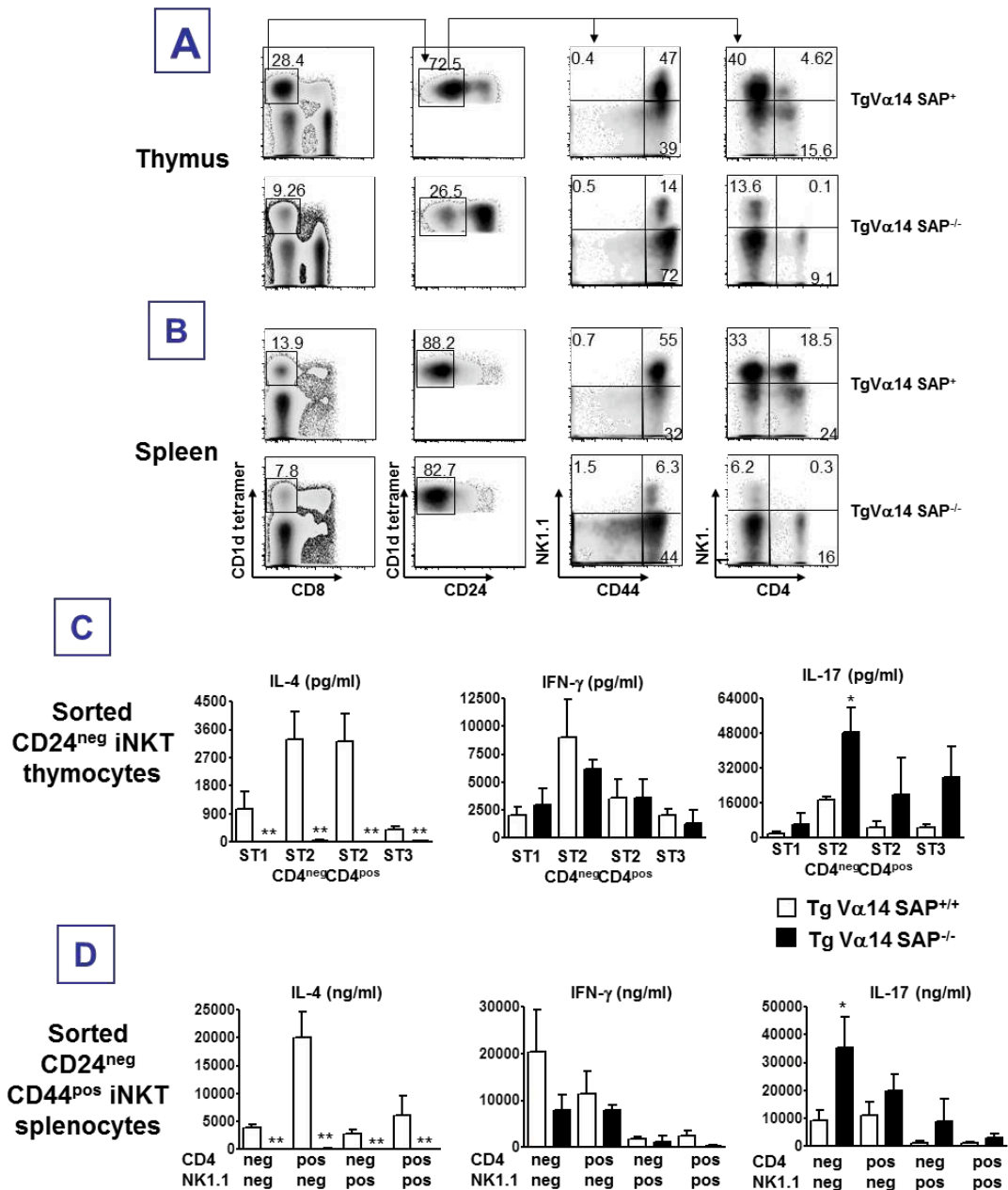
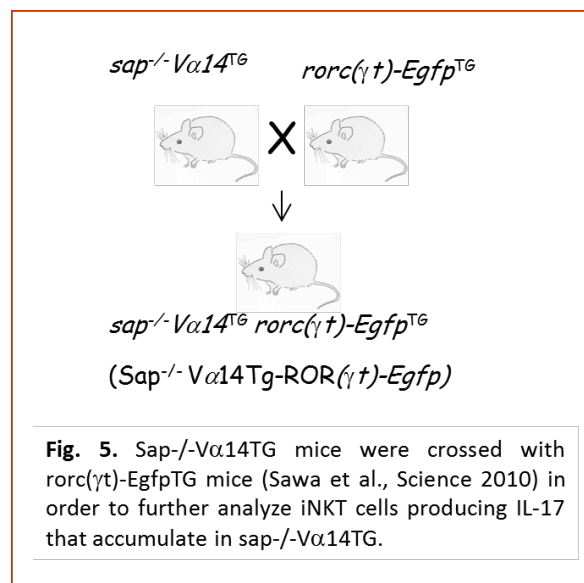


Fig. 4. Thymic (A) and splenic (B) mononuclear cells from Sap^{-/-} Vα14Tg and Sap^{+/+} Vα14Tg mice were stained with CD1d/tetramers, anti-CD8, anti-CD24, anti-NK1.1 and anti-CD44 mAbs. Representative FACS profile of CD44 and NK1.1 expression (right panels) among gated CD1d tetramer^{pos}CD24^{neg} iNKT cells. Data are representative of six independent experiments. Percentages of each subset are indicated in quadrants.

iNKT cell subsets from thymus and spleen were analyzed for their capacities to produce IL-4, IFN-γ and IL-17. For thymic subsets (C), CD1d tetramer^{pos}CD24^{neg} thymocytes sorted into 4 distinct subsets corresponding to the different developmental NKT cell stages (ST). For splenic subsets (D), CD1d tetramer^{pos}CD24^{neg} splenocytes were sorted into 4 distinct subsets. Sorted cells were further stimulated with α-GalCer in the presence of irradiated macrophages. Three days later, IL-4, IFN-γ and IL-17 were measured in the supernatants by ELISA. In all experiments, no cytokines were detected in the absence of α-GalCer or with stimulated APCs alone (data not shown). Data represent the mean ± s.e.m. of 3 to 5 individual experiments.

Nous avons précédemment démontré que le facteur de transcription ROR γ t est le principal marqueur permettant la distinction des lymphocytes iNKT17 (Michel et al. 2008). En conséquence et afin de mieux caractériser les sous-populations de cellules iNKT, c'est-à-dire les cellules iNKT17 et les cellules iNKT conventionnelles, nous avons croisé les souris Sap^{-/-} V α 14-Tg avec des souris rorc(γ t)-Egfp^{TG} (Sawa et al. 2010), et avons obtenu des souris Sap^{-/-} V α 14^{TG} rorc(γ t)-Egfp^{TG} (nommées par la suite Sap^{-/-} V α 14Tg-ROR(γ t)-Egfp) (**Fig. 5**). Ces nouvelles souris triple mutantes vont nous permettre d'analyser avec plus de précision les lymphocytes iNKT producteurs d'IL-17 s'accumulant dans les souris Sap^{-/-} V α 14-Tg.



L'étude phénotypique montre que la fréquence des cellules iNKT17 ROR γ t^{pos} est très fortement accrue chez les souris Sap^{-/-} V α 14Tg-ROR(γ t)-Egfp, comparativement aux souris Sap^{+/+} V α 14Tg-ROR(γ t)-Egfp. Au niveau des ganglions périphériques, la fréquence des cellules iNKT ROR γ t^{pos}, est multipliée par 2, alors qu'au niveau du thymus, de la rate et du foie, elle est multipliée par 10 (**Fig. 6**). Ces résultats montrent que l'absence de SAP favorise le développement des lymphocytes iNKT17, suggérant que SAP favorise la différenciation des lymphocytes iNKT conventionnels producteurs d'IL-4.

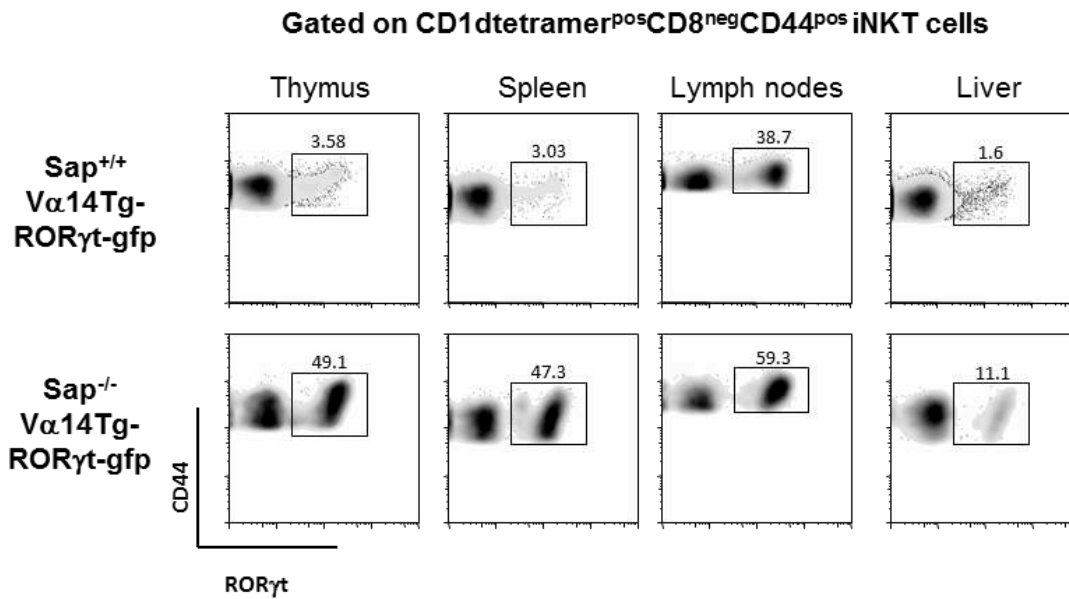


Fig. 6. Mononuclear cells from thymus, spleen, lymph nodes and liver from Sap^{-/-} Vα14Tg-RORγt-gfp or Sap^{+/+} Vα14Tg-RORγt-gfp mice were stained with CD1d/tetramers, anti-CD8, anti-CD24, and anti-CD44 mAbs. Representative FACS profile of CD44 and RORγt-gfp expression among gated CD1d tetramer^{pos}CD8^{neg}CD24^{neg} iNKT cells. Data are representative of six independent experiments. Percentages of CD44^{pos}RORγt-gfp^{pos} cells are indicated.

Nos résultats montrent que les cellules iNKT RORγt^{neg} produisent de l'IL-4 chez les souris Sap^{+/+} Vα14Tg-ROR(γt)-Egfp, mais que chez les souris Sap^{-/-} Vα14Tg-ROR(γt)-Egfp, ces mêmes cellules sont incapables de sécréter de l'IL-4. Par ailleurs, chez les souris Sap^{+/+} Vα14-Tg-ROR(γt)-Egfp, les sous-populations des lymphocytes iNKT montrent des profils cytokiniques différents : les cellules iNKT RORγt^{neg} produisent de l'IL-4 alors que les cellules iNKT RORγt^{pos} produisent de l'IL-17. Au vue de ces résultats, nous nous sommes demandés si les cellules iNKT RORγt^{pos} des souris Sap^{-/-} Vα14Tg-ROR(γt)-Egfp étaient capables de produire plus d'IL-17 que leurs homologues chez les souris Sap^{+/+} Vα14Tg-ROR(γt)-Egfp. Les résultats montrent que ce n'est pas le cas puisque les pourcentages de cellules produisant de l'IL-17 sont équivalents chez les deux types de souris (environ 6% dans la rate et 10% dans les ganglions lymphoïdes) (**Fig. 7**). Cela indique que l'augmentation d'IL-17 observée n'est pas due à une augmentation de production cellulaire mais est bien due à une accumulation des cellules iNKT RORγt^{pos} productrices d'IL-17 dans les organes lymphoïdes des souris Sap^{-/-} Vα14Tg-ROR(γt)-Egfp.

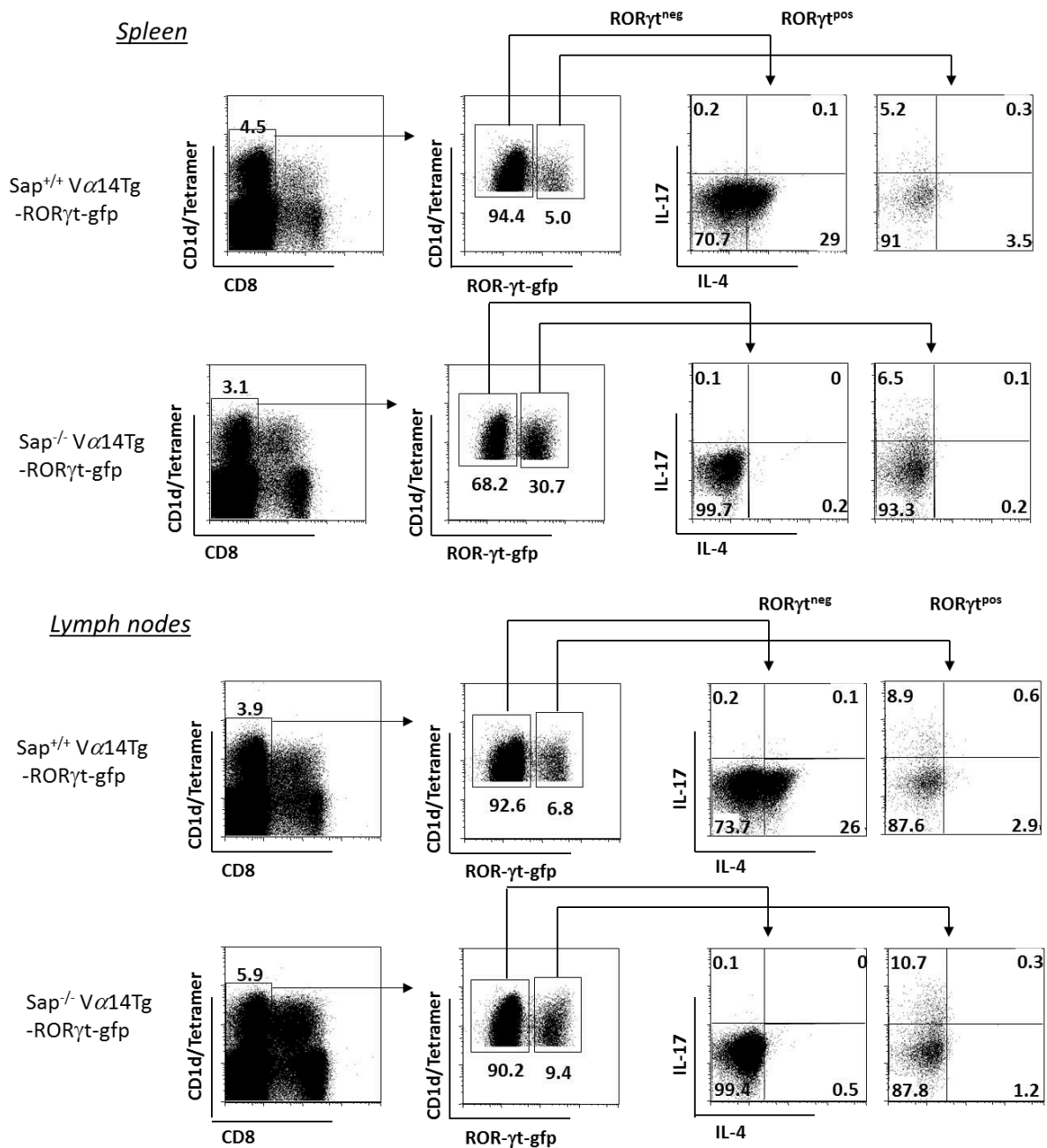


Fig. 7. Intracellular IL-4 and IL-17 staining was performed after *in vitro* stimulation of freshly isolated mononuclear cells from spleen or lymph node with PMA+ionomycin for 4 h. Representative FACS profile of IL-4 and IL-17 production by gated CD1d tetramer^{pos} CD8^{neg}RORγt-gfp^{pos} or CD1d tetramer^{pos} CD8^{neg}RORγt-gfp^{pos} from *Sap*^{-/-} Vα14Tg-RORγt-gfp or *Sap*^{+/+} Vα14Tg-RORγt-gfp mice. Data are representative of at least four independent experiments. Percentages of each subset are indicated in quadrants.

En conclusion, nos observations montrent que, après la sélection positive, SAP est indispensable au développement des cellules iNKT conventionnelles productrices d'IL-4 alors qu'elle n'est pas nécessaire au développement des cellules iNKT ROR γ t^{pos} productrices d'IL-17 (**Fig. 7**). Notre hypothèse est que le signal transduit par la liaison des récepteurs SLAM, lors de la sélection positive, favorise la différenciation des précurseurs des cellules iNKT en cellules iNKT conventionnelles productrices d'IL-4 réduisant par conséquent la différenciation en cellules iNKT ROR γ t^{pos} productrices d'IL-17. Nos résultats suggèrent également que SAP n'influencerait pas directement l'acquisition des propriétés fonctionnelles des cellules iNKT17.

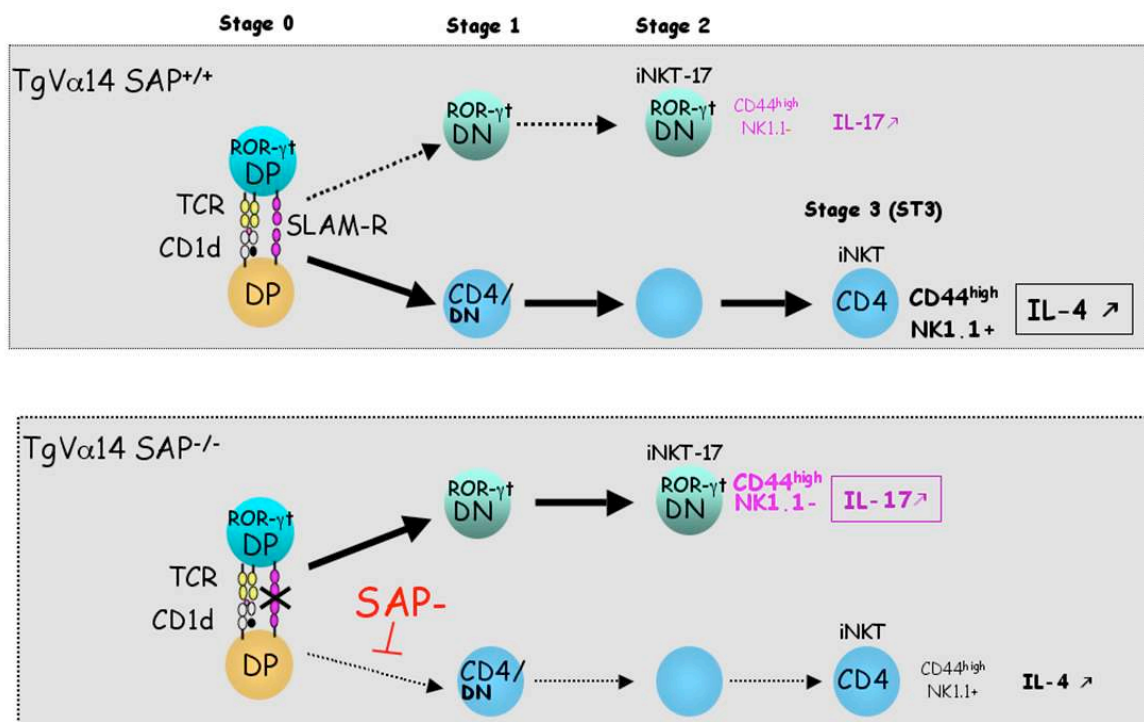


Fig. 7. SAP absence favors IL-17-producing iNKT development

Ainsi nos données suggèrent que la voie de signalisation induite par la molécule SAP joue un rôle critique dans l'acquisition des propriétés fonctionnelles des cellules iNKT conventionnelles productrices d'IL-4 et d'IFN-γ.

Article n°2 :

Des conditions pro-inflammatoires induisent une production rapide d'IL-17 et d'IL-22 par les cellules T CD4^{pos} CD44^{hi} RORγt^{pos} PLZF^{pos} naturelles.

Massot B, Diem S, Ohnmacht C, Latour S, Eberl G, Dy M, Leite-de-Moraes MC

(Article soumis)

L'IL-17 est une cytokine pro-inflammatoire produite, notamment, par des cellules T non conventionnelles, émigrant du thymus complètement différenciées. Il s'agit des lymphocytes iNKT17, des lymphocytes Tγδ CD27^{neg} et des lymphocytes Th17 naturels nouvellement décrits.

Nos travaux ont permis de mettre en évidence une population de lymphocytes T CD4^{pos} RORγt^{pos} mature et fonctionnelle au niveau du thymus (CD44^{high}) puisqu'elle est capable de produire de l'interleukine 17 en réponse à une stimulation du TCR. Cette population est bien distincte des lymphocytes iNKT17 caractérisés grâce au tétramère CD1d-PBS57. La sécrétion de l'IL-17 par les lymphocytes Th17 étant fréquemment associée à une sécrétion d'IL-22, nous avons mis en évidence que les lymphocytes T CD4^{pos} RORγt^{pos} CD44^{high} naturels sont capables de produire à la fois de l'IL-17 et de l'IL-22 et que la production d'IL-22 est dépendante de la cytokine pro-inflammatoire IL-23. Par ailleurs, une brève stimulation des lymphocytes T CD4^{pos} RORγt^{pos} avec l'IL-23 et l'IL-1β suffit à induire leur co-production d'IL-17 et d'IL-22, démontrant des similitudes avec les cellules lymphoïdes de type inné comme les cellules Tγδ. L'IL-23 et l'IL-1β sont des cytokines produites, notamment, par les cellules dendritiques en réponse aux PAMPs et à l'activation des TLR, dont le TLR4. Nous avons donc testé l'effet des produits de stimulation des BMDCs, obtenus *in vitro*, sur les lymphocytes T CD4^{pos} RORγt^{pos} CD44^{high} et nous avons mis en évidence que ces cellules peuvent alors produire très rapidement de l'IL-17 et de l'IL-22. Nous avons également confirmé le rôle des cytokines IL-23 et IL-1β sur l'activation des lymphocytes T CD4^{pos} RORγt^{pos} CD44^{high} par l'ajout d'anticorps neutralisants. De plus, l'injection de LPS à des souris sauvages a également suffi, en seulement 3h, à induire la production d'IL-22 associée à l'IL-17 par les lymphocytes T CD4^{pos} RORγt^{pos} CD44^{high}.

Nous avons ensuite confirmé la présence et la fonctionnalité des lymphocytes T CD4^{pos} RORγt^{pos} CD44^{high} naturels en périphérie, dans les ganglions lymphoïdes, la rate et le foie. Dans l'hypothèse où seuls les lymphocytes T CD4^{pos} RORγt^{pos} CD44^{high} naturels peuvent répondre de manière innée aux stimuli inflammatoires, nous avons différencié *in vitro* des cellules T CD4^{pos} naïves issues de la rate en

lymphocytes Th17 induits. Après stimulation par IL-23 et IL-1 β , les cellules Th17 induites sont incapables de produire de l'IL-17 ce qui confirme que cette capacité de réponse de type inné est bien inhérente aux cellules T CD4^{pos} ROR γ t^{pos} CD44^{high} naturelles et non aux lymphocytes Th17 induits. Ces résultats ont également été vérifiés *in vivo* après injection de cellules T CD4^{pos} CD44^{low} CD62L^{pos} à des souris receveuses RAG^{-/-}. Les lymphocytes Th17 différenciés *de novo* sont fonctionnels mais incapables de répondre aux surnageants des BMDCs stimulés par le LPS. De plus, au vu de l'importance de la flore intestinale pour le développement des lymphocytes Th17 conventionnels, nous avons testé l'effet des surnageants des BMDCs stimulés par le LPS sur les lymphocytes Th17 de la lamina propria intestinale. Nous n'avons pas observé de réponse de la part des lymphocytes T, suggérant que les lymphocytes T CD4^{pos} ROR γ t^{pos} CD44^{high} naturels sont bien distincts des lymphocytes Th17 conventionnels. Pour compléter cette observation, nous avons analysé l'influence de l'IL-6 sur le développement des lymphocytes T CD4^{pos} ROR γ t^{pos} CD44^{high} naturels et nous avons démontré que la fréquence de ces cellules dans le thymus est identique chez les souris déficientes en IL-6 comparativement aux souris sauvages.

Il a été décrit que le facteur de transcription PLZF n'est pas seulement important pour le développement des lymphocytes iNKT (Cf. Introduction), mais qu'il participe également à la différenciation des lymphocytes T conventionnels. Ainsi PLZF est directement associé à l'augmentation de la fréquence des lymphocytes T CD44^{hi} mémoire/effecteurs en périphérie, nous avons déterminé la présence de ce facteur dans les lymphocytes T CD4^{pos} ROR γ t^{pos} CD44^{high} naturels. Nos résultats montrent que PLZF est exprimé par les lymphocytes T CD4^{pos} ROR γ t^{pos} CD44^{high} naturels présents au niveau du thymus et des ganglions lymphoïdes mais pas par les lymphocytes Th17 conventionnels de la lamina propria intestinale, confirmant la distinction entre ces deux populations de lymphocytes T producteurs d'IL-17.

L'ensemble de ces résultats suggère fortement l'existence de deux sous-populations de lymphocytes T producteurs d'IL-17 et d'IL-22 avec des processus de différenciation bien distincts: les lymphocytes Th17 induits (ou conventionnels) et les lymphocytes T CD4^{pos} ROR γ t^{pos} CD44^{high} PLZF^{pos} naturels, assimilables aux lymphocytes Th17 naturels décrits récemment. Nos résultats démontrent clairement une nouvelle caractéristique primordiale des lymphocytes Th17 naturels, c'est-à-dire leur capacité à répondre très rapidement à des stimuli pro-inflammatoires. Nous établissons également que l'expression des facteurs de transcription ROR γ t et PLZF est un critère d'identification de ces

lymphocytes Th17 naturels. De plus, les résultats montrent que la production d'IL-22 par ces cellules est dépendante d'un environnement pro-inflammatoire. Cela révèle de nouvelles fonctions potentielles à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative.

BRIEF DEFINITIVE REPORT**Pro-inflammatory conditions induce prompt IL-17 and IL-22 production by naturally occurring ROR γ ^{pos}CD44^{high}CD4^{pos}PLZF^{pos} T cells**

Bérangère MASSOT¹, Séverine DIEM¹, Caspar OHNMACHT², Sylvain LATOUR³, Michel DY¹
Gérard EBERL² and Maria C. LEITE-DE-MORAES¹

¹CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) UMR (Unité Mixte de Recherche) 8147, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, France, Hôpital Necker Enfants Malades, Paris, France.

²Institut Pasteur, Lymphoid Tissue Development Unit, 75724 Paris, France.

³Laboratoire du Développement Normal et Pathologique du Système Immunitaire, INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale) 768, Hôpital Necker Enfants-Malades, 75015 Paris, France.

Corresponding author :

Maria C. LEITE-DE-MORAES,

CNRS UMR 8147, Faculté de Médecine René Descartes, Paris V, Hôpital Necker,

161 rue de Sèvres, 75743, Paris, Cedex 15, France;

Tel: +33 1 44 49 53 94, Fax : +33 1 44 49 06 76;

e-mail : maria.leite-de-moraes@parisdescartes.fr

Condensed title: ROR γ ^{pos} naturally occurring CD4^{pos} T cells

Characters counts (including spaces): around 27,000

Figures: 4 (plus 2 Sup Figs)

Keywords : CD4 T cells, ROR γ t, IL-17, IL-22, innate cells, TLR, PLZF

Abbreviations: PI (PMA plus ionomycin), ROR γ t (retinoic acid receptor-related orphan receptor γ t), PLZF (promyelocytic leukemia zinc finger)

Abstract

Interleukin 17A (IL-17) and IL-22 are produced by Th17 cells and have an indispensable role in inflammatory responses. Naïve CD4^{pos} T cells require a polarization process to generate effector Th17. Using ROR γ t-gfp mice, we identified naturally occurring thymic ROR γ t^{pos}CD4^{pos}CD44^{high}TCR $\alpha\beta$ ^{pos} cells that produce high levels of IL-17 as early as 4h of stimulation with anti-CD3 plus anti-CD28. They require IL-23 during this brief time to secrete IL-22. In contrast to conventional Th17 lymphocytes obtained after in vitro or in vivo polarization from sorted CD4^{pos}CD44^{neg}CD62L^{pos} T cells, ROR γ t^{pos}CD4^{pos}CD44^{high}TCR $\alpha\beta$ ^{pos} T cells promptly produce IL-17 and IL-22 in response to recombinant or IL-23- plus IL-1 β -containing supernatants from TLR4 stimulated dendritic cells. Naturally occurring ROR γ t^{pos}CD4^{pos}CD44^{high} T cells express PLZF, are also present in spleen and overrepresented in lymph nodes. Another distinct feature of this cytokine-responsive ROR γ t^{pos}CD4^{pos}CD44^{high} T cells is their absence from the gut, whereas conventional Th17 cells are currently detected. It is noteworthy that 3h following in vivo TLR4 agonist administration suffices to reveal their cytokine secretory ability. Collectively, these results demonstrated that IL-17 and IL-22 naturally occurring ROR γ t^{pos}CD4^{pos}CD44^{high}TCR $\alpha\beta$ ^{pos}PLZF^{pos} T cell producers promptly respond to pro-inflammatory stimulus, placing this particular CD4^{pos} T cell population as potentially effector cells in innate immunity.

Introduction

Several types of functionally distinct T cell subsets develop in the thymus. They are mainly composed of conventional naïve CD4 and CD8 T cells with a highly diverse TCR repertoire recognizing peptides in the context of classical MHC class II or class I molecules, respectively (Nikolich-Zugich et al., 2004; Klein et al., 2009; Carpenter and Bosselut, 2010). In peripheral lymphoid organs, naive CD4^{pos} T lymphocytes differentiate into effector cells upon stimulation, thus enabling them to produce cytokines, such as IFN- γ , IL-4 or IL-17A (or IL-17) (Zhu et al., 2010; Locksley, 2009). The process of Th1, Th2 or Th17 differentiation requires several days and the presence of antigens, specific cytokines and transcription factors (Mucida and Cheroutre, 2010; Paul and Zhu, 2010; Cua and Tato, 2010), which render mature cells responsive to a second antigen stimulation. By contrast, some T cells leave the thymus fully differentiated, ready for cytokine secretion without further polarization. The typical representatives of these “non-conventional” T cells are invariant Natural Killer T (iNKT), $\gamma\delta$ T and natural Th17 (nTh17) cells (Michel et al., 2007, 2008; Ribot et al., 2009; Marks et al., 2009; Kim et al., 2011). IL-17-producing iNKT cell subset (iNKT17 cells) (Michel et al., 2007, 2008; Moreira-Teixeira et al., 2011) originates from a new thymic differentiation pathway dependent on the transcription factor ROR γ t (retinoic acid receptor-related orphan receptor γ t) (Michel et al., 2008). Similar to iNKT17 cells, CD27^{neg} $\gamma\delta$ T cells acquire the ability to secrete IL-17 during their thymic development and are distinct from their CD27^{pos} counterpart that produce IFN- γ (Ribot et al., 2009). Recently, a particular population of CD4^{pos} T cells capable to produce IL-17 was also described in the thymus (Marks et al., 2009; Kim et al., 2011). They were called natural Th17 (nTh17) cells. Thymic selection of nTh17 cells depends on major histocompatibility complex (MHC) class II on medullary, rather than on cortical thymic epithelium like conventional CD4^{pos} T cells (Kim et al., 2011).

Most IL-17-producing conventional Th17 cells secrete IL-22 concomitantly (Liang et al., 2006). It is generally acknowledged that IL-17 and IL-22 can act in concert to resist bacterial infections, even though they exert potentially distinct roles in autoimmune or allergic responses (Eyerich et al., 2010).

IL-17 seems to be a key cytokine for psoriasis treatment (Waisman, 2012), while IL-22 is important for epithelial cell homeostasis, intestinal defense and homeostasis, tissue repair and wound healing (Satoh-Takayama et al., 2008; Colonna, 2009; Sonnenberg et al., 2011). Thus, an essential issue is to determine which T cell populations can produce IL-17 associated or not with IL-22 and the nature of the antigens and stimulus capable to favor this production.

Here we show that in addition to iNKT cells (Michel et al., 2008), a fraction of mature thymic $\text{TCR}\alpha\beta^{\text{pos}}\text{CD4}^{\text{pos}}\text{CD8}^{\text{neg}}\text{CD44}^{\text{high}}$ T cells express the transcription factor ROR γ t. Actually, this $\text{TCR}\alpha\beta^{\text{pos}}\text{CD4}^{\text{pos}}\text{CD8}^{\text{neg}}\text{CD44}^{\text{high}}$ ROR γ t^{pos} thymocytes are endowed with the ability to promptly secrete IL-17. These naturally occurring ROR γ t^{pos} CD4^{pos} T cells require IL-23 to co-produce IL-22 and are distinct from conventional Th17 cells. Finally, $\text{TCR}\alpha\beta^{\text{pos}}\text{CD4}^{\text{pos}}\text{CD44}^{\text{high}}$ ROR γ t^{pos} T cells promptly secrete IL-17 and IL-22 in response to inflammatory conditions, namely IL-1 β associated to IL-23 and TLR4 agonist, underlying a novel functional property of these cells.

Results and Discussion

ROR γ t^{pos} expression and IL-17 production by TCR $\alpha\beta$ ^{pos}CD4^{pos}CD8^{neg}CD44^{high} T cells.

The transcription factor ROR γ t, expressed during thymic T cell development by immature thymocytes, is progressively lost during T cell maturation. We have characterized a distinct subset of ROR γ t^{pos} iNKT cells that produce high levels of IL-17, the iNKT17 cells (Michel et al., 2007, 2008). These cells are already present in the thymus, where they follow an alternative differentiation pathway to acquire the CD44^{high}ROR γ t^{pos} phenotype and the ability to produce IL-17. Actually, ROR γ t expression is the better marker to discriminate iNKT17 cells from the others iNKT cell subsets. Here, we determined the proportion of mature TCR $\alpha\beta$ cells, in addition to iNKT17 cells, that also express ROR γ t, the typical transcription factor associated with IL-17 production, using *Rorc-Gfp* mice (Lochner et al., 2008). Immature ROR γ t^{pos} thymocytes were excluded in all following experiments by analyzing solely the cells that had already rearranged their TCR $\alpha\beta$ expressed on the cell surface, express CD4 but not CD8 and displayed high levels of the CD44 marker. TCR $\alpha\beta$ ^{pos}CD4^{pos}CD8^{neg}CD44^{high} population could include iNKT cells, thus we always take care to exclude CD1dtetramer^{pos} cells in our analysis. We found that up to 10% of mature TCR $\alpha\beta$ ^{pos}CD4^{pos}CD8^{neg}CD44^{high}CD1dtetramer^{neg} thymocytes, that representing around 1% of total thymocytes, expressed ROR γ t (**Fig. 1 A**). Thus, these results suggest that a population of mature CD4^{pos}TCR $\alpha\beta$ ^{pos}CD1dtetramer^{neg} thymocytes, similar to IL-17-producing iNKT17 cells (Michel et al., 2008), could be present in the thymus. This was the case since electronically sorted ROR γ t^{pos} TCR $\alpha\beta$ ^{pos}CD4^{pos}CD8^{neg}CD44^{high}CD1dtetramer^{neg} thymocytes produced IL-17 when stimulated by coated anti-CD3 plus anti-CD28 mAb (**Fig. 1 B**). IL-17 was not detected in the supernatants of any corresponding ROR γ t^{neg} counterparts (**Fig. 1 B**). These findings clearly demonstrated that ROR γ t^{pos}TCR $\alpha\beta$ ^{pos}CD4^{pos}CD8^{neg}CD44^{high}CD1dtetramer^{neg} thymocytes are functional and full capable to secrete IL-17. Henceforth, naturally occurring IL-17-producing ROR γ t^{pos}TCR $\alpha\beta$ ^{pos}CD4^{pos}CD8^{neg}CD44^{high}CD1dtetramer^{neg} thymocytes will be referred to as natural ROR γ t^{pos}CD4^{pos}CD44^{high} cells.

IL-22 production by natural ROR γ ^{pos}CD4^{pos}CD44^{high} thymocytes requires IL-23.

Conventional naïve CD4^{pos} T lymphocytes committed to become Th17 cells co-produce IL-17 and IL-22 (Korn et al., 2009). However, several recent reports describing particular T or innate cells secreting either IL-17 or IL-22 (Eyerich et al., 2010; Spits and Di Santo, 2011), raise the question whether natural ROR γ ^{pos}CD4^{pos}CD44^{high} cells also co-secrete IL-22. To address this issue, we sorted TCR $\alpha\beta$ ^{pos}CD4^{pos}CD8^{neg}CD44^{high}CD1d tetramer^{neg} into ROR γ ^{pos} and ROR γ ^{neg} thymic T cells *ex vivo* before stimulating them with coated anti-CD3 plus anti-CD28 mAbs. No detectable IL-22 was observed (**Fig. 1 C**). We further postulated that this failure to secrete IL-22 might be surpassed by the presence of the pro-Th17 cytokine IL-23. This possibility was confirmed since ROR γ ^{pos}CD4^{pos}CD44^{high} thymic cells did effectively produce IL-22 when IL-23 was added to the stimulation (**Fig. 1 C**). No IL-17 or IL-22 production was detected by their ROR γ ^{neg} counterparts (**Fig. 1 C**). Therefore, these results suggest that IL-22 production by ROR γ ^{pos}CD4^{pos}CD44^{high} cells could be more tightly controlled than IL-17 secretion since these cells require IL-23 as a critical stimulus to produce IL-22.

To evaluate the proportion of IL-17 and IL-22 producers, we freshly isolated thymic cells and exposed them to PMA + ionomycin (PI) in the presence of brefeldin A during 4h before perform an intracellular staining for cytokine detection. We found a high frequency of IL-17^{pos} cells, as expected among gated ROR γ ^{pos}CD4^{pos}CD44^{high} cells, and IL-22 production was greatly enhanced when PI stimulation was supplemented with IL-23 (**Fig 1 D**). Of note, the majority of IL-22^{pos} cells co-produce IL-17. ROR γ ^{pos}CD4^{pos}CD44^{high} cells generated IL-22 within only 4h showing that they are immediately responsive to IL-23 (**Fig 1 D**). By contrast, ROR γ ^{neg} T cells produced neither IL-17 nor IL-22 (**Fig 1 D**). Globally, our findings support the conclusion that natural ROR γ ^{pos}CD4^{pos}CD44^{high} cells are thymic committed to produce IL-17 and IL-22 in response to adequate stimulus.

ROR γ t^{pos}CD4^{pos}CD44^{high} thymic T cells produce IL-17 and IL-22 in response to IL-1 β plus IL-23.

As a rule, conventional T cells can produce IL-17 and IL-22 once they have undergone Th17 polarization and in response to TCR cross-linking. In this respect, they differ from innate lymphoid cells as $\gamma\delta$ T cells that secrete IL-17 in response to IL-1 β plus IL-23 (Sutton et al., 2009). Here, we found that ROR γ t^{pos}CD4^{pos}CD44^{high} thymocytes (**Fig. 1 D**) produce IL-17 and IL-22 as early as 4h of IL-23 plus IL-1 β stimulation. IL-23 alone had no significant effect on the induction of cytokine production by ROR γ t^{pos}CD4^{pos}CD44^{high} cells. No cytokine production was detected among gated ROR γ t^{neg} cells (**Fig. 1 D**).

ROR γ t^{pos}CD4^{pos}CD44^{high} thymic T cells are prone to produce IL-17 and IL-22 in response to TLR4 agonist stimulation.

IL-1 β and IL-23 are secreted by dendritic cells in response to PAMPs, including TLRs agonists (Higgins et al., 2006; Kastelein et al., 2007). To analyze the possible stimulation of ROR γ t^{pos}CD4^{pos}CD44^{high} cells by endogenous inflammatory cytokines, we first tested the capacity of culture supernatants from TLR4 agonist-stimulated BMDCs to induce cytokine production by ROR γ t^{pos}CD4^{pos}CD44^{high} cells. We found that these supernatants were fully capable to induce both IL-17 and IL-22 production by thymic ROR γ t^{pos}CD4^{pos}CD44^{high} cells (**Fig 1 E**). Noteworthy, no PMA plus ionomycin, polyclonal TCR complex stimulation as anti-CD3 mAbs or antigens were used in these experiments. The ability of supernatants from DC stimulated with TLR4 agonist to induce cytokine production by ROR γ t^{pos}CD4^{pos}CD44^{high} cells was blocked by the addition of neutralizing anti-IL-23 plus anti-IL-1 β mAb (**Fig 1 E**), clearly implicating these soluble factors.

ROR γ t^{pos}CD4^{pos}CD44^{high} T cells are present and functional in secondary lymphoid organs of naïve mice

ROR γ t^{pos}CD4^{pos}CD44^{high} cells are not only detected in the thymus but also in peripheral organs in steady state as spleen, liver and lymph nodes (**Sup Fig 1 A**). Their frequency among CD4^{pos}CD44^{high} T cells varied according to the organ, but they are more represented in lymph nodes (**Sup Fig 1 A**). These observations raise the question whether their functions are conserved in the periphery. This is undoubtedly the case since ROR γ t^{pos}CD4^{pos}CD44^{high} cells from lymph nodes produced IL-17 and IL-22 when stimulated by PMA, ionomycin plus IL-23, IL-1 β plus IL-23 (**Sup Fig 1 B**) or supernatants from DC stimulated with TLR4 agonist (**Fig. 2 A**). The later stimulation is also IL-1 β plus IL-23 dependent since blocked by the respective anticorps (**Fig. 2 A**).

ROR γ t^{pos}CD4^{pos}CD44^{high} T cells are distinct from conventional Th17 cells

It could be argued that the ability of CD4^{pos}ROR γ t^{pos} cells to secrete cytokines following IL-1 β plus IL-23 stimulation was inherent to Th17 cells. However, this was not the case, since Th17 cells differentiated *in vitro* from naïve CD4^{pos}CD44^{neg}CD62L^{pos} T and further stimulated with IL-1 β plus IL-23 generated no detectable IL-17 (**Fig 2 B**). They are competent to secrete IL-17 following anti-CD3 plus anti-CD28 stimulation showing their functionality (**Fig 2 B**). A possibility is that *in vitro* Th17 differentiation is not enough to acquire the ability to respond to IL-1 β plus IL-23 stimulation. In order to solve this question, we electronically sorted naïve CD4^{pos}CD44^{neg}CD62L^{pos}Ly5.1^{neg} T cells and then adoptively transferred them to Rag^{-/-} Ly5.1^{pos} mice. Ten days later, CD4^{pos}Ly5.1^{neg} cells were stimulated with anti-CD3 plus anti-CD28 or TLR conditioned supernatants. As expected, in response to anti-CD3 plus anti-CD28 stimulation, naïve CD4^{pos}Ly5.1^{neg} cells acquired the CD44^{high} phenotype (**Fig 2 C**), and a fraction of these cells produced IL-17 following anti-CD3 plus anti-CD28 stimulation (**Fig 2 D**), showing that naïve T cells can *in vivo* differentiate into Th17 cells when transferred to Rag^{-/-}

mice. In contrast, we observe no significant production of IL-17 by these CD4^{pos}CD44^{high} Ly5.1^{neg} cells when stimulated with TLR conditioned supernatants (**Fig 2 E**). As a positive control, lymph nodes CD4^{pos}CD44^{pos}Ly5.1^{neg} from WT mice secreted IL-17 and IL-17 plus IL-22 following PMA plus ionomycin or with TLR conditioned supernatants (**Fig 2 F, G and H**). These findings clearly demonstrated that in our conditions naïve CD4^{pos} T cells differentiated into Th17 cells, both *in vitro* and *in vivo*, were unable to produce IL-17 or IL-22 in response to TLR conditioned supernatants.

Previous studies have reported that symbiotic microbiota is required for the generation of conventional Th17 cells and that these cells are present in the intestine (Ivanov et al., 2008; Lochner et al., 2011). Here we found that RORγt^{pos}TCRαβ^{pos}CD4^{pos}CD44^{pos} are present in the lamina propria of naïve mice and produce IL-17 following anti-CD3 plus anti-CD28 stimulation (**Fig 2 I**). However, they were unable to secrete these cytokine in response to TLR conditioned supernatants (**Fig 2 I**). The supernatant was efficient in the system since it was capable to induce IL-22 production by gated TCRαβ^{neg} cells (**Sup Fig 2**), supporting previous results showing that others cells than TCRαβ^{pos} lymphocytes can secrete IL-22 in response to IL-1β plus IL-23 stimulation (Colonna, 2009).

Previous reports indicated the role for the intestinal microbiota and IL-6 in the differentiation of naïve T cells into Th17 cells (Ivanov et al., 2006; Ivanov et al., 2008; Lochner et al., 2011). RORγt^{pos} nTh17 cells were present at similar frequency among gated CD4^{pos}CD44^{pos}CD8^{neg}CD1d tetramer^{neg} cells from the thymus of germ-free-RORγt-gfp and SPF-RORγt-gfp mice (**Fig 2 J**). Similarly, their frequency was maintained in IL-6^{-/-} RORγt-gfp mice compared to controls (**Fig 2 K**). Previous studies reported the influence of microbiota and IL-6 on the peripheral development of naïve T cells into Th17 cells (Ivanov et al., 2006; Ivanov et al., 2008; Lochner et al., 2011). Our findings show that naturally occurring IL-17-producing RORγt^{pos}CD4^{pos}CD44^{high} cells are already present in the thymus of IL-6^{-/-} or germ-free mice.

Taken together, these results indicate that naturally occurring thymic $\text{ROR}\gamma^{\text{pos}}\text{CD4}^{\text{pos}}\text{CD44}^{\text{high}}$ cells constitute a particular T cell subset distinct from conventional Th17 cells since they are already present in the thymus of IL-6^{-/-} and germ-free mice and absent from the lamina propria of SPF mice.

PLZF expression by natural $\text{ROR}\gamma^{\text{pos}}\text{CD4}^{\text{pos}}\text{CD44}^{\text{high}}$

Here we have a major dilemma since we functionally identified the naturally occurring IL-17- and IL-22-producing cells but their precise phenotype remains to be determined. In fact, $\text{ROR}\gamma^{\text{pos}}\text{CD4}^{\text{pos}}\text{CD44}^{\text{high}}$ cells also exist in lamina propria but there are unable to secrete IL-17 and IL-22 in response to TLR conditioned supernatants. Recent studies reported that transgenic expression of the transcriptional repressor promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) during T cell development induced a T cell intrinsic program leading to an increase in peripheral CD44^{hi} memory/effector T cells (Kovalovsky et al., 2010). These cells could produce large amounts of several cytokines upon primary activation suggesting that PLZF expression could characterize innate T cell functions. Moreover, a previous report suggested that transgenic PLZF T cells produced significantly increased levels of IL-17, but the source of IL-17 was not completely analyzed (Kovalovsky et al., 2010). Here we reported that thymic and lymph nodes $\text{ROR}\gamma^{\text{pos}}\text{CD4}^{\text{pos}}\text{CD44}^{\text{high}}$ cells express higher level of PLZF than their $\text{ROR}\gamma^{\text{neg}}\text{CD4}^{\text{pos}}\text{CD44}^{\text{high}}$ counterpart (**Fig 3 B and C**). It is noteworthy that we failed to detect PLZF expression by intestinal $\text{ROR}\gamma^{\text{pos}}\text{CD4}^{\text{pos}}\text{CD44}^{\text{high}}$ cells (**Fig 3 D**). These cells were also unable to secrete IL-17 and IL-22 in response to TLR conditioned supernatants (**Fig 2 G**). Taken together, these findings support the notion that naturally occurring $\text{ROR}\gamma^{\text{pos}}\text{CD4}^{\text{pos}}\text{CD44}^{\text{high}}$ T cells are distinct from peripheral naïve differentiated Th17 cells. Furthermore, our findings indicate that $\text{ROR}\gamma$ associated to PLZF are major markers to distinguish naturally occurring $\text{ROR}\gamma^{\text{pos}}\text{CD4}^{\text{pos}}\text{CD44}^{\text{high}}$ T cells from Th17 cells.

ROR γ ^{pos}CD4^{pos}CD44^{high} cells are prone to produce IL-17 and IL-22 in response to in vivo TLR4 agonist stimulation.

To analyze the possible stimulation of ROR γ ^{pos}CD4^{pos}CD44^{high} cells by in vivo inflammatory stimulus, TLR4 agonist was injected into mice and 3h later lymph nodes were removed and stimulated in vitro with PI during 4h. This brief in vivo TLR stimulation sufficed to amplify IL-17 and to induce IL-22 production by naturally occurring ROR γ ^{pos}CD4^{pos}CD44^{high} cells (**Fig 4, A and B**), indicating that in vivo stimulation by TLR4 agonists will favor the effector activation of these cells.

TLRs are primary involved in innate immune response to microorganisms, but also contribute to inflammatory responses observed in autoimmune or allergic disease. In this context, TLRs stimulation can induce IL-17 production by promoting Th17 differentiation (Mills, 2011). Our data indicate that naturally occurring ROR γ ^{pos}CD4^{pos}CD44^{high} T cells could constitute a non negligible source of IL-17 and IL-22 that will influence the inflammatory responses observed in these pathologies.

We cannot exclude the possibility that ROR γ ^{pos}CD4^{pos}CD44^{high} T cells described here are similar to the previously described nTh17 cells (Tanaka et al. 2009; Marks et al. 2009; Kim et al. 2011). However, our findings reveal new features of this intriguing subset of CD4^{pos} T cells, their expression of PLZF and their ability to promptly respond to pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β and IL-23. Additionally, we reported the critical role of IL-23 to promote IL-22 production by naturally occurring IL-17-producing ROR γ ^{pos}CD4^{pos}CD44^{high} T cells. Consequently, our findings shed new lights on the understanding of the mechanisms implicated in the stimulation of these cells and their potential role in inflammatory process and propose that both antigen recognition and innate inflammatory stimuli should be considered when proposing new treatments involving Th17 cells. This is in accord with previous reports showing that some treatments targeting IL-23 to decrease Th17

generation failed to inhibit psoriasis development (Waisman, 2012) probably because the sources of IL-17 and/or IL-22 were others cells than conventional Th17 lymphocytes. Additionally, our findings define a previously unknown paradigm, namely the evidence for a mechanism of thymic development leading to the maintenance of ROR γ t expression and responsiveness to cytokine stimulation independently of TCR cross-linking on a CD4^{pos} MHC class II selected T cell population.

Material and Methods

Animals. Six to 8 week-old BAC transgenic *Rorc*(γ t)-*Gfp*^{TG}, IL-6^{-/-}*Rorc*(γ t)-*Gfp*^{TG} (Lochner et al., 2008), and C57BL/6J male mice bred in our facility or purchased from Janvier (Les Genest St. Isle, France) were used. Germ-free *Rorc*(γ t)-*Gfp*^{TG} mice were obtained from an SPF *Rorc*(γ t)-*Gfp*^{TG} colony by aseptic cesarean section followed by the adoption of the cesarean-derived pups by germ-free foster mothers. Animal experiments were performed according to the guidelines of the French Institutional Committee.

Cell preparation. Lymphocytes were isolated from the liver, spleen or lymph nodes as previously described (Michel et al., 2007, 2008).

FACS analysis. Mononuclear cells (MNC) were stained with CD1d-tetramer-APC or PE, TCR β -APC or eFluor450, anti-CD4-APC-H7, anti-CD8-Pacific Blue or V500 and/or anti-CD44-PECy7 (BD Pharmingen, eBioscience). For intracellular staining, cells were fixed using IntraPrep kit (Beckman Coulter), according to the manufacturer's protocols, or in 4% PFA, washed, and permeabilized with 0.5% saponin (Sigma-Aldrich), then incubated with anti-IL-17-PerCP-Cy5.5 or APC and anti-IL-22-PE or PerCPeFluor710 or isotype controls (eBioscience or R&D Systems) and anti-GFP-FITC Mab (Invitrogen) and/or anti-PLZF-APC (R&D Systems). Cells were then washed and analyzed in a FACSCanto II (Becton Dickinson) using FlowJo software.

Enrichment and cell sorting. Thymic, splenic or lymph nodes CD44^{pos}CD4^{pos} T cells were enriched by depleting CD8^{pos}, CD19^{pos}, CD62L^{pos} cells labeled with the corresponding mAbs (BD Pharmingen) and with anti-rat Ig-coated magnetic beads (Bio-Ademabeads, Ademtech), according to the manufacturer's protocols. Depleted populations were then stained with CD1d-tetramer-APC (provided by NHI tetramer facilities), anti-CD4-APC-Cy7, anti-CD8-Pacific Blue anti-CD44-PECy7 and anti-TCR $\gamma\delta$ -PE (BD

Pharmingen, eBioscience) and distinct ROR γ t^{pos} and ROR γ t^{neg} cell subsets were sorted using a FACSaria cell sorter (Becton Dickinson). In some experiments, naïve CD62L^{pos}CD4^{pos} T cells were electronically sorted before their differentiation into Th17 cells.

Cell culture. Electronically sorted CD4^{pos}CD44^{pos} CD1dtetramer^{neg}TCR γ δ ^{neg} cells were exposed at 10⁵ cells per ml to coated anti-CD3 and anti-CD28 mAb (BD Pharmingen) for 48h. All culture supernatants were harvested and stored at -80°C until IL-17 and IL-22 detection by ELISA, as described (14), using R&D Systems kits. In parallel, T cells were stimulated for 4h with 10⁻⁸ M phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), 10⁻⁶ M ionomycin in the presence of 2 μ g/ml of brefeldin A (all from Sigma-Aldrich) with or without IL-23 (10ng/ml) and/or IL-1 β (10ng/ml) (R&D Systems). Cells were then stained for intracellular cytokine detection.

In another set of experiments, enriched CD4^{pos}CD44^{pos} cells were incubated for 16 h with supernatants of bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs). Brefeldin A was added during the last 3 h. To obtain BMDCs supernatants, these cells were previously stimulated for 6 h with lipopolysaccharides (LPS, K235, Sigma-aldrich) at 100 ng/ml, or medium. BMDCs were obtained after culture with GM-CSF (PeproTech) at 2 ng/ml for 6 days. In some experiments, anti-IL-1 β (10 μ g/ml) and anti-IL-23 (10 μ g/ml), from eBioscience, were added to the stimulation of CD4^{pos}CD44^{pos} cells with BMDCs supernatants.

Isolation of lamina proprial lymphocytes. After cleaning, cutting open lengthwise, and rinsing with PBS, the small intestine was cut into 2-inch segments. Epithelial cells were removed by sequential shaking in EDTA-containing PBS solutions. The remaining tissue was digested at 37°C in T cell media containing 1 mg/ml collagenase IV (Gibco) and 1U/ml DNase I (Sigma-Aldrich), and lamina proprial lymphocytes were isolated by a 40/80% Percoll gradient. Isolated cells were incubated for 16 h with supernatants of bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs), as previously.

Th17 differentiation and stimulation. Naive CD4^{pos}CD62L^{high}CD44^{low} T cells were electronically sorted from the spleen and then cultured for 72h with coated anti-CD3 and anti-CD28 in Th17 conditions (TGF- β (2 ng/ml), TNF α (10 ng/ml), IL-1 β (10 ng/ml) and IL-6 (20 ng/ml), all from R&D Systems). Differentiated Th17 cells were then washed, rested overnight and further stimulated with coated anti-CD3 plus anti-CD28 or IL-23 plus IL-1 β for 72h and cytokine production was further measured in the supernatants by ELISA.

In vivo stimulation. Mice were injected intravenously with LPS at 25 μ g per mouse or control medium. After 3h, peripheral lymph nodes (inguinal, axillary, mesenteric and mediastinal) were harvested and cell suspensions prepared. Cells were then stimulated for 3h with PMA plus ionomycin in the presence of brefeldin A. Cells were then stained for surface markers and intracellular cytokine detection.

Adoptive transfer of CD44^{low}CD4⁺ T cells. CD44^{low}CD4⁺ cells were isolated from the spleen of wild-type Ly5.2 (WT) donors and injected through the retro-orbital route into *Rag*^{-/-} Ly5.1 recipients. Naive CD4⁺ T cells were enriched by depleting CD8^{pos}, CD19^{pos} cells labeled with the corresponding mAbs (BD Pharmingen) and with anti-rat Ig-coated magnetic beads (Bio-Adembeads, Ademtech), according to the manufacturer's protocols. Depleted populations were then stained with CD1d-tetramer-APC (provided by NHI tetramer facilities), anti-CD4-APC-H7, anti-CD8-eFluor450 and anti-CD44-PECy7 (BD Pharmingen, eBioscience), then cells were sorted using a FACS Aria cell sorter (Becton Dickinson). A total of 3×10^6 cells in 150 μ l NaCl was injected into age-matched *Rag*^{-/-} Ly5.1 hosts. After 10 days, thymus, spleen and lymph nodes were collected. Homogenates were incubated for 16 h with supernatants of bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs), as previously, or anti-CD3 plus anti-CD28. Transferred cells were distinguished using anti-Ly5.1-PE (eBioscience), and IL-22 and IL-17 production was assessed by intracellular staining and flow cytometry.

Statistical analysis. Nonparametric Mann-Whitney test was used to calculate significance levels for all measurements. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

Acknowledgments

We are grateful to Elke Schndneider for discussions and especially indebted to NIH Tetramer facilities for providing CD1d/PBS57 tetramers. We are thankful to Jérôme Mégret and Corinne Garcia-Cordier (Necker Institute) for cell sorting and to our mouse house'team.

This work was supported by institute funds from the CNRS, Université René Descartes - Paris V, and the ANR MIME ASTHMA-IL-17 and ANR MI2 iNKT-SAP to M.C. Leite-de-Moraes.

The authors have no conflicting financial interests.

References

- Carpenter, A. C., R. Bosselut. 2010. Decision checkpoints in the thymus. *Nat Immunol* 11:666-673.
- Colonna, M. 2009. Interleukin-22-producing natural killer cells and lymphoid tissue inducer-like cells in mucosal immunity. *Immunity* 31:15-23.
- Cua, D. J., C. M. Tato. 2010. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol* 10:479-489.
- Eyerich, S., K. Eyerich, A. Cavani, and C. Schmidt-Weber. 2010. IL-17 and IL-22: siblings, not twins. *Trends Immunol* 31:354-361.
- Higgins, S.C., A.G. Jarnicki, E.C. Lavelle, and K.H. Mills. 2006. TLR4 mediates vaccine-induced protective cellular immunity to *Bordetella pertussis*: role of IL-17-producing T cells. *J Immunol* 177:7980-7989.
- Ivanov, Il, B.S. McKenzie, L. Zhou, C.E. Tadokoro, A. Lepelley, J.J. Lafaille, D.J. Cua, and D.R. Littman. 2006. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 126:1121-1133.
- Ivanov, Il, L. Frutos Rde, N. Manel, K. Yoshinaga, D.B. Rifkin, R.B. Sartor, B.B. Finlay, and D.R. Littman. 2008. Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microbe* 4:337-349.
- Kastelein, R.A., C.A. Hunter, and D.J. Cua. 2007. Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation. *Annu Rev Immunol* 25:221-242.
- Kim, J.S., J.E. Smith-Garvin, G.A. Koretzky, and M.S. Jordan. 2011. The requirements for natural Th17 cell development are distinct from those of conventional Th17 cells. *J Exp Med* 208:2201-2207.
- Klein, L., M. Hinterberger, G. Wirnsberger, B. Kyewski. 2009. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol* 9:833-844.
- Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka, and V.K. Kuchroo. 2009. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 27:485-517.
- Kovalovsky, D, E.S. Alonzo, O.U. Uche, M. Eidson, K.E. Nichols, D.B Sant'Angelo DB. 2010. PLZF induces the spontaneous acquisition of memory/effector functions in T cells independently of

- NKT cell-related signals. *J Immunol* 184:6746-6755.
- Lochner, M., L. Peduto, M. Cherrier, S. Sawa, F. Langa, R. Varona, D. Riethmacher, M. Si-Tahar, J. P. Di Santo, G. Eberl. 2008. In vivo equilibrium of proinflammatory IL-17+ and regulatory IL-10+ Foxp3+ RORgamma t+ T cells. *J Exp Med* 205:1381-1393.
- Locksley, R. M. 2009. Nine lives: plasticity among T helper cell subsets. *J Exp Med* 206:1643-1646.
- Lochner, M., M. Berard, S. Sawa, S. Hauer, V. Gaboriau-Routhiau, T.D. Fernandez, J. Snel, P. Bousso, N. Cerf-Bensussan, and G. Eberl. 2011. Restricted microbiota and absence of cognate TCR antigen leads to an unbalanced generation of Th17 cells. *J Immunol* 186:1531-1537.
- Marks, B.R., H.N. Nowyhed, J.Y. Choi, A.C. Poholek, J.M. Odegard, R.A. Flavell, and J. Craft. 2009. Thymic self-reactivity selects natural interleukin 17-producing T cells that can regulate peripheral inflammation. *Nat Immunol* 10:1125-1132.
- Michel, M. L., A. C. Keller, C. Paget, M. Fujio, F. Trottein, P. B. Savage, C. H. Wong, E. Schneider, M. Dy, M. C. Leite-de-Moraes. 2007. Identification of an IL-17-producing NK1.1(neg) iNKT cell population involved in airway neutrophilia. *J Exp Med* 204:995-1001.
- Michel, M. L., D. Mendes-da-Cruz, A. C. Keller, M. Lochner, E. Schneider, M. Dy, G. Eberl, M. C. Leite-de-Moraes. 2008. Critical role of ROR-gammat in a new thymic pathway leading to IL-17-producing invariant NKT cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:19845-19850.
- Mills, K.H. 2011. TLR-dependent T cell activation in autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 11:807-822.
- Moreira-Teixeira, L., M. Resende, M. Coffre, O. Devergne, J. P. Herbeuval, O. Hermine, E. Schneider, L. Rogge, F. M. Ruemmele, M. Dy, A. Cordeiro-da-Silva, M. C. Leite-de-Moraes. 2011. Proinflammatory Environment Dictates the IL-17-Producing Capacity of Human Invariant NKT Cells. *J Immunol* 186:5758-5765.
- Mucida, D., H. Cheroutre. 2010. The many face-lifts of CD4 T helper cells. *Adv Immunol* 107:139-152.
- Nikolich-Zugich, J., M. K. Slifka, I. Messaoudi. 2004. The many important facets of T-cell repertoire diversity. *Nat Rev Immunol* 4:123-132.
- Paul, W. E., J. Zhu. 2010. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nat Rev Immunol* 10:225-235.
- Ribot, J.C., A. deBarros, D.J. Pang, J.F. Neves, V. Peperzak, S.J. Roberts, M. Girardi, J. Borst, A.C. Hayday, D.J. Pennington, and B. Silva-Santos. 2009. CD27 is a thymic determinant of the balance

between interferon-gamma- and interleukin 17-producing gammadelta T cell subsets. *Nat Immunol* 10:427-436.

Satoh-Takayama, N., C.A. Vosshenrich, S. Lesjean-Pottier, S. Sawa, M. Lochner, F. Rattis, J.J. Mention, K. Thiam, N. Cerf-Bensussan, O. Mandelboim, G. Eberl, J.P. Di Santo. 2008. Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal NKp46+ cells that provide innate mucosal immune defense. *Immunity* 29:958-970.

Sonnenberg, G. F., L. A. Fouser, D. Artis. 2011. Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. *Nat Immunol* 12:383-390.

Spits, H., and J.P. Di Santo. 2011. The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. *Nat Immunol* 12:21-27.

Sutton, C.E., S.J. Lalor, C.M. Sweeney, C.F. Brereton, E.C. Lavelle, and K.H. Mills. 2009. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity* 31:331-341.

Waisman, A. 2012. To be IL again-anti-interleukin-17 treatment for psoriasis. *N. Engl. J. Med.* 366:1251-1252.

Zhu, J., H. Yamane, W. E. Paul. 2010. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu Rev Immunol* 28:445-489.

Figure Legends.

Fig. 1. Tissue distribution of and cytokine production by ROR γ t^{pos}CD4^{pos}CD44^{high} T thymic cells.

Distribution of ROR γ t^{pos} cells among gated CD1d tetramer^{neg} TCR γ δ ^{neg} TCR α β ^{pos} CD4^{pos} CD8^{neg} CD44^{high} T cells recovered from thymus (A) of *Rorc*(γ t)-*Gfp* mice. Data are representative of three to five independent experiments, n=3. Percentages of each subset are indicated in quadrants. *Ex vivo* mononuclear cells from thymus (B) were electronically sorted into CD1d tetramer^{neg} TCR α β ^{pos} CD4^{pos} CD8^{neg} CD44^{high} ROR γ t^{pos} or ROR γ t^{neg} T cells. These sorted ROR γ t^{pos} and ROR γ t^{neg} fractions were stimulated with coated anti-CD3 plus anti-CD28 mAb for 72h. IL-17 was measured in the supernatants. Data represent means \pm s.e.m. from 3 to 8 individual experiments, pool 3 thymus by experiment. Sorted CD1d tetramer^{neg} TCR α β ^{pos} CD4^{pos} CD8^{neg} CD44^{high} ROR γ t^{pos} (dark histograms) and ROR γ t^{neg} (light histograms) thymic (D) T cells were stimulated with coated anti-CD3 plus anti-CD28 mAb with or without IL-23 for 72h. IL-22 was measured in the supernatants. No IL-22 was detected in unstimulated control supernatants (< 10 pg/ml). Data represent means \pm s.e.m. from 3 to 4 individual experiments, pool 3 thymus or spleen by experiment. (E) Intracellular IL-17 and IL-22 staining were performed after *in vitro* stimulation of freshly isolated thymocytes with PMA+ionomycin (PI), PI plus IL-23, IL-23 or IL-1 β plus IL-23 for 4h. Representative FACS profile of IL-17 and IL-22 production by gated CD4^{pos} CD1d tetramer^{neg} TCR α β ^{pos} CD8^{neg} CD44^{high} ROR γ t^{neg} (top) or ROR γ t^{pos} (bottom). Data are representative of at least five independent experiments, pool 2 organs per experiment. Percentages of each subset are indicated in quadrants. (F)

Enriched CD4^{pos} CD1d tetramer^{neg} TCR α β ^{pos} CD8^{neg} CD44^{high} ROR γ t^{pos} thymocytes cells cultured for 16 h in the presence of supernatants from BMDCs stimulated or not (medium) with TLR4 agonist with or without anti-IL-1 β plus anti-IL-23 neutralizing antibodies. Representative FACS profile of IL-17 and IL-22 production on gated nTh17 cells. Data are representative of three independent experiments. n = 2-3.

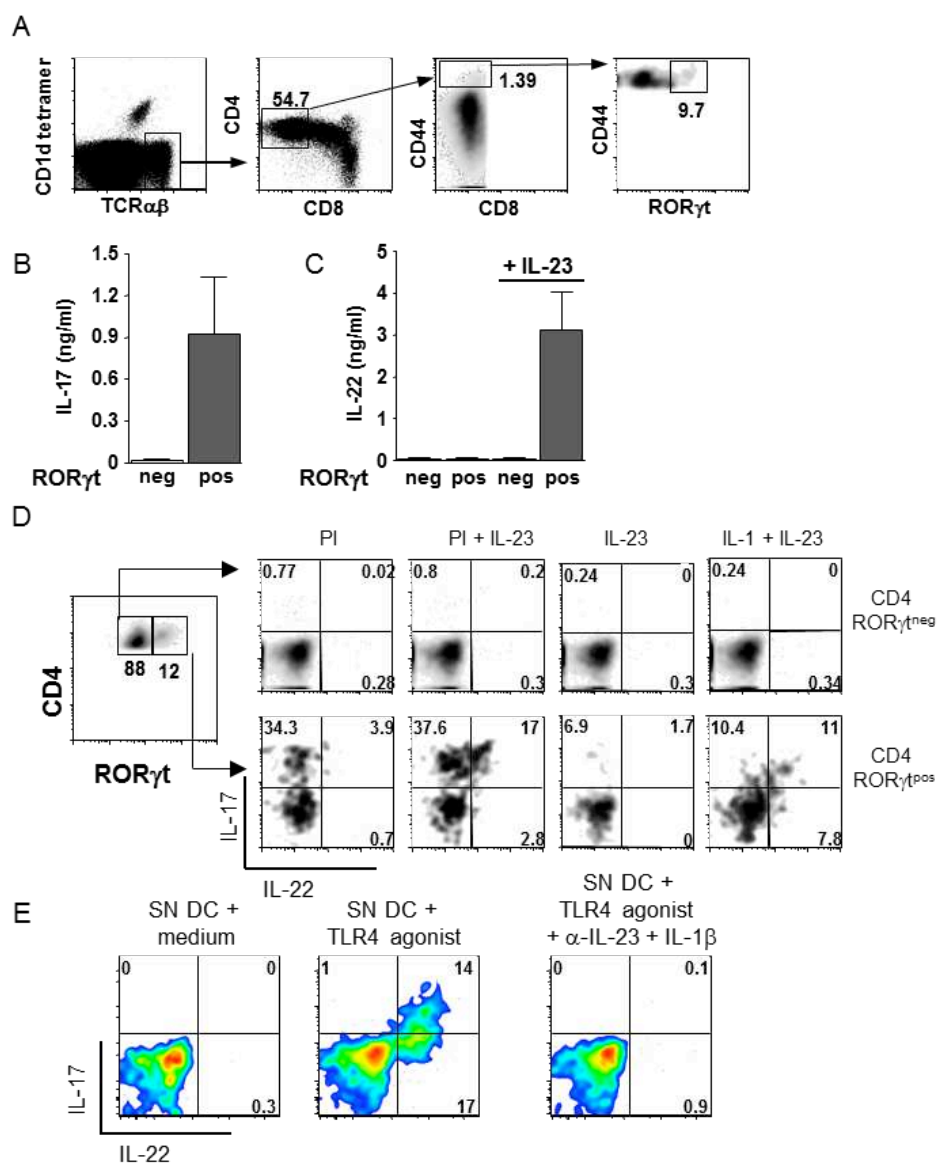
Fig. 2: IL-1 β plus IL-23 induce IL-17 and IL-22 production by naturally occurring TCR $\alpha\beta$ ^{pos} CD4^{pos} CD8^{neg} CD44^{high} ROR γ t^{pos} cells but not by conventional Th17 cells. (A) Freshly isolated lymph node cells were stimulated with supernatants from BMDCs stimulated or not (medium) with TLR4 agonist with or without anti-IL-1 β plus anti-IL-23 neutralizing antibodies for 16h. Representative FACS profile of IL-17 and IL-22 production by gated lymph node CD1d tetramer^{neg} TCR $\alpha\beta$ ^{pos} CD4^{pos} CD8^{neg} CD44^{high} ROR γ t^{pos}. Data are representative of 3-4 independent experiments. $n = 2$ Percentages of each subset are indicated in quadrants. (B) Naïve electronically sorted CD62L^{pos}CD44^{neg}CD4^{pos} T cells were differentiated into Th17, as described in Material and Methods. Th17 cells the obtained were further stimulated at 5×10^5 cells per ml with anti-CD3 plus anti-CD28 (positif control), IL-1 β plus IL-23 or medium (negative control) for 72h. IL-17 was measured in the supernatants. Data represent means \pm s.e.m. from 4 independent experiments, pool 3 mice per experiment. (C to E) Naïve electronically sorted CD62L^{pos}CD44^{neg}CD4^{pos}Ly5.1^{neg} T cells from wild-type mice were adoptively transferred to Rag^{-/-} Ly5.1^{pos} mice as described in Material and Methods. Ten days later transferred cells were obtained and further in vitro stimulated for 4h. Representative FACS profile of IL-17 and IL-22 production by transferred CD4^{pos}Ly5.1^{neg} T cells gated on CD44^{pos} in response to anti-CD3 and anti-CD28 mAb (D) or SN DC + TLR4 agonist (E). (F to H) Positive controls showing the corresponding FACS profile described in C to E but using T cells from wild-type mice. (I) FACS analysis of lamina propria cells isolated from the small intestine of *Rorc*(γ t)-*Gfp*^{TG} mice and further stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 mAb (top panels) or SN DC + TLR4 agonist (bottom panels). Plots were first gated on CD1d tetramer^{neg} TCR $\alpha\beta$ ^{pos} CD4^{pos} CD8^{neg} cells (not shown) then on CD44^{pos} ROR γ t^{pos} or ROR γ t^{neg}. (J and K) Dots represent the percentages of ROR γ t^{pos} cells amog gated CD4^{pos} CD1d tetramer^{neg} TCR $\alpha\beta$ ^{pos} CD4^{pos} CD8^{neg} CD44^{high} thymocytes freshly isolated from Germ-free *Rorc*(γ t)-*Gfp*^{TG}, SPF *Rorc*(γ t)-*Gfp*^{TG} (J), IL-6^{-/-} *Rorc*(γ t)- *Gfp*^{TG} or IL-6^{+/+} *Rorc*(γ t)- *Gfp*^{TG} (K) mice. Each symbol represents data from a single mouse. Horizontal bars indicate the means.

Fig. 3: PLZF expression by naturally occurring $\text{TCR}\alpha\beta^{\text{pos}}$ CD4^{pos} CD8^{neg} $\text{CD44}^{\text{high}}$ $\text{ROR}\gamma\text{t}^{\text{pos}}$ cells.

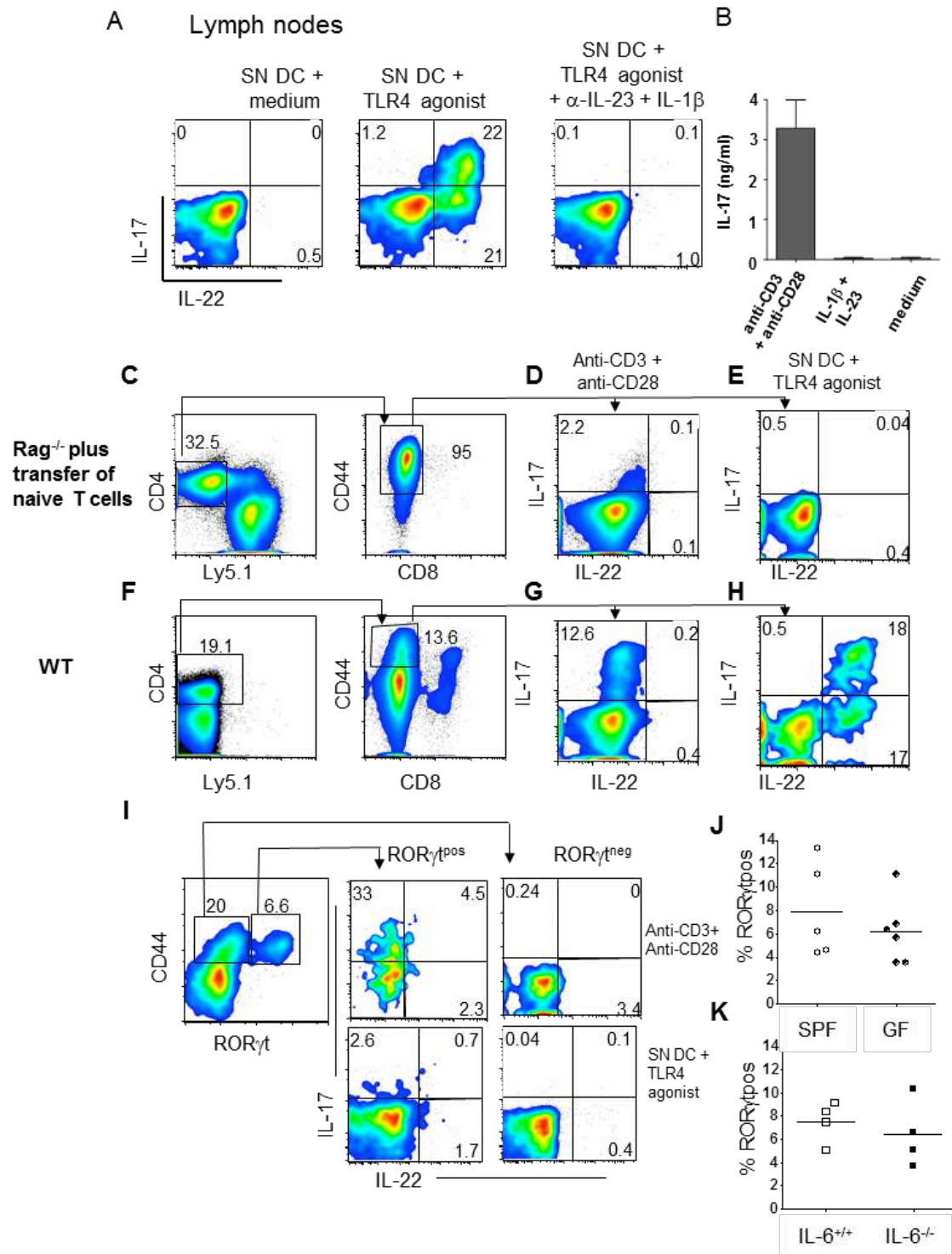
Distribution of isotype control (A) or PLZF (B to D) expressing cells gated on $\text{CD1d tetramer}^{\text{neg}}$ $\text{TCR}\gamma\delta^{\text{neg}}$ $\text{TCR}\alpha\beta^{\text{pos}}$ CD4^{pos} CD8^{neg} $\text{CD44}^{\text{high}}$ $\text{ROR}\gamma\text{t}^{\text{pos}}$ (solid lines) or $\text{ROR}\gamma\text{t}^{\text{neg}}$ (dashed lines) cells. Cells were recovered from thymus (B), lymph nodes (A and C) and lamina propria (D). Data are representative of two independent experiments, n=4.

Fig. 4: In vivo TLR4 agonist induced cytokine production by $\text{TCR}\alpha\beta^{\text{pos}}$ CD4^{pos} CD8^{neg} $\text{CD44}^{\text{high}}$ $\text{ROR}\gamma\text{t}^{\text{pos}}$ cells.

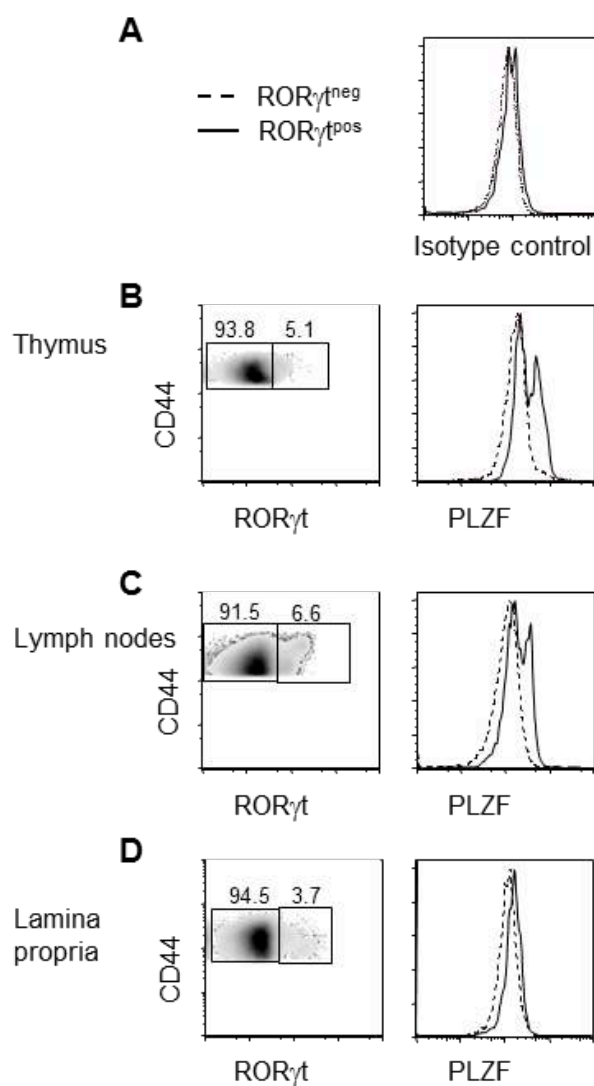
(A and B) Mice were injected i.v. with NaCl or TLR4 agonist and lymph nodes cells were recovered 3 h later. IL-17 and IL-22 production by nTh17 cells were analyzed by intracellular staining after 3 h of incubation in presence of PMA/ionomycin and brefeldin A. (C) Representative FACS profile of IL-17 and IL-22 production on gated nTh17 cells. (D) Percentages of $\text{IL-17}^{\text{pos}}\text{IL-22}^{\text{neg}}$ (circles), $\text{IL-17}^{\text{pos}}\text{IL-22}^{\text{pos}}$ (squares), $\text{IL-17}^{\text{neg}}\text{IL-22}^{\text{pos}}$ (triangles) among gated nTh17 cells from NaCl (empty symbols) or TLR4 agonist (full symbols) treated mice. Each symbol (D) represents data from a single mouse. Horizontal bars indicate the means. Statistical significance was determined in a Mann-Whitney test. ***p<0.001



Massot et al. Figure 1

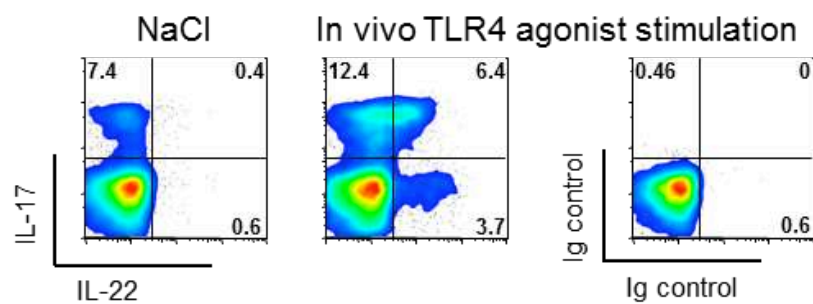


Massot et al. Fig 2

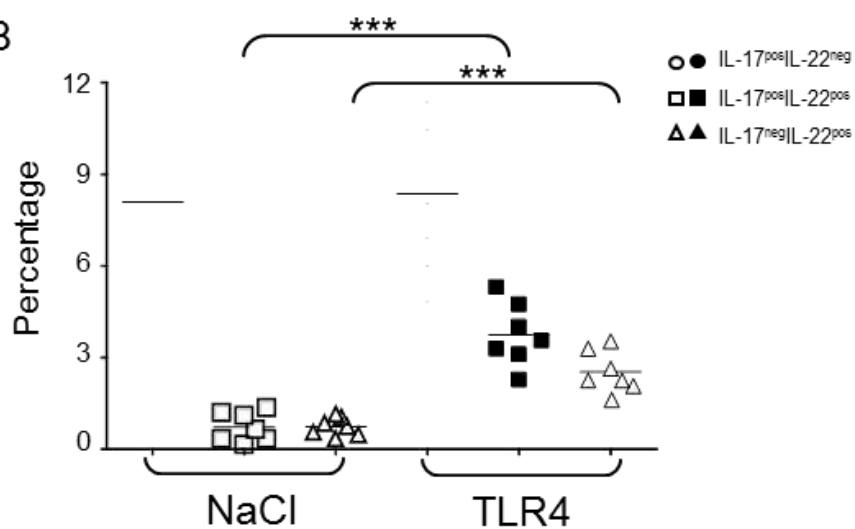


Massot et al. Fig 3

A Lymph nodes



B



Massot et al., Fig 4

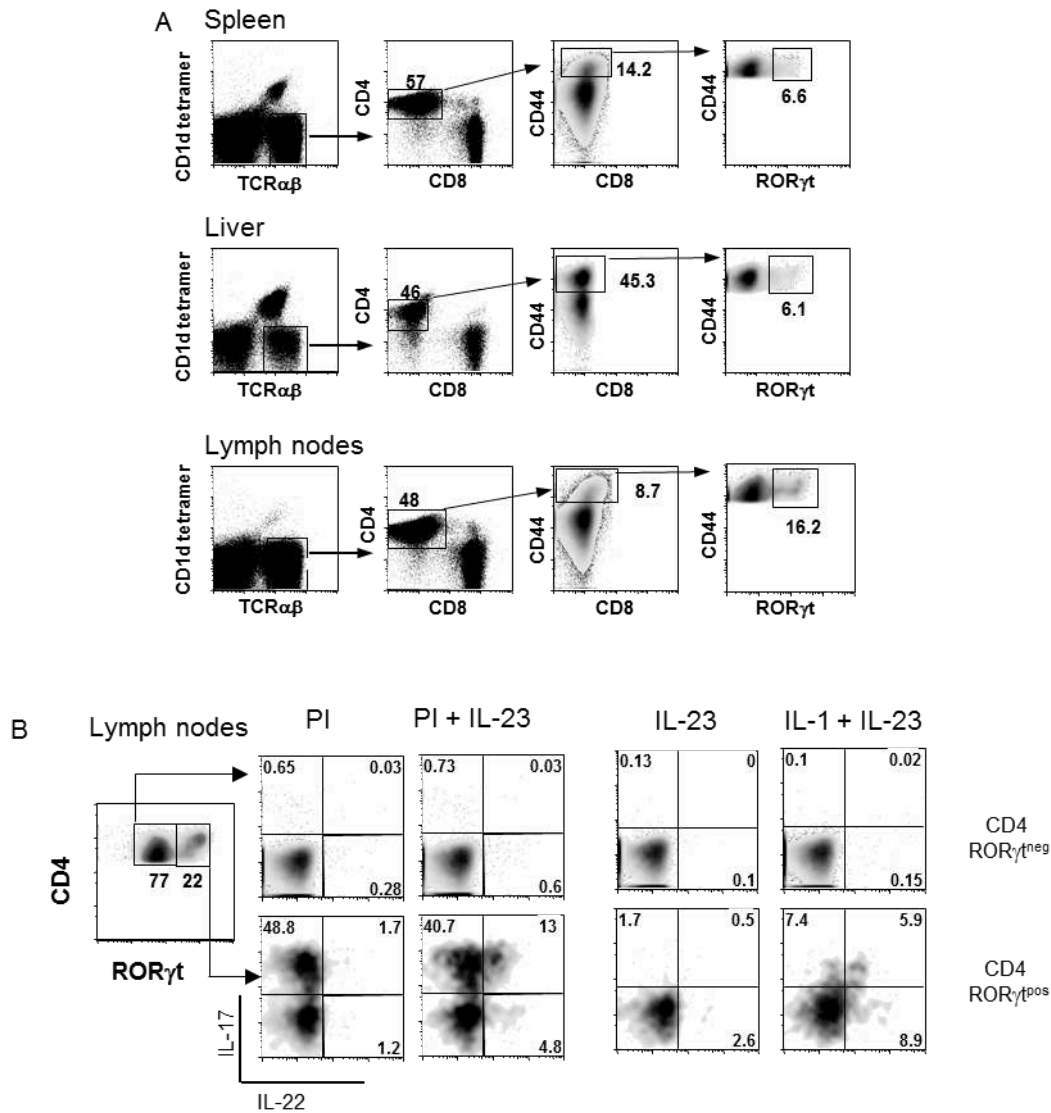


Fig. Sup 1. Tissue distribution of and cytokine production by peripheral RORγt^{pos}CD4^{pos}CD44^{high} T cells. Distribution of RORγt^{pos} cells among gated CD1d tetramer^{neg} TCRγδ^{neg} TCRαβ^{pos} CD4^{pos} CD8^{neg} CD44^{high} T cells recovered from spleen, liver or lymph nodes (A) of *Rorc(γt)-Gfp* mice. Data are representative of three to five independent experiments, n=3. Percentages of each subset are indicated in quadrants. (B) Intracellular IL-17 and IL-22 staining were performed after *in vitro* stimulation of freshly isolated lymph nodes cells with PMA+ionomycin (PI), PI plus IL-23, IL-23 or IL-1β plus IL-23 for 4h. Representative FACS profile of IL-17 and IL-22 production by gated CD4^{pos}CD1d tetramer^{neg}TCRαβ^{pos}CD8^{neg}CD44^{high} RORγt^{neg} (top) or RORγt^{pos} (bottom). Data are representative of at least five independent experiments, pool 2 organs per experiment. Percentages of each subset are indicated in quadrants.

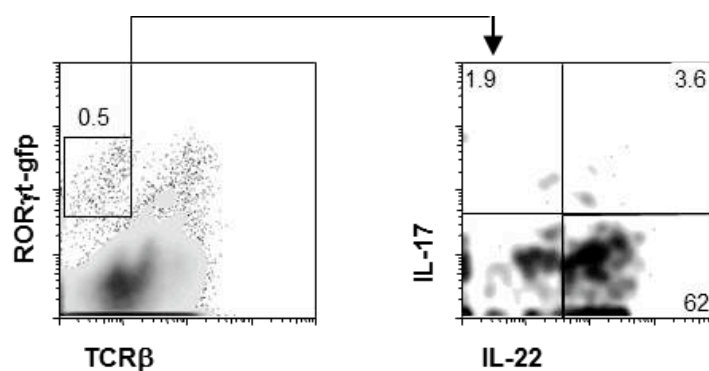


Fig Sup. 2. FACS analysis of lamina propria cells isolated from the small intestine of *Rorc*(γ t)-*Gfp*^{TG} mice and further stimulated with SN DC + TLR4 agonist. Plots were first gated on TCR $\alpha\beta$ ^{neg} ROR γ t^{pos} (left panel). Representative FACS profile of IL-17 and IL-22 production by gated gated TCR $\alpha\beta$ ^{neg} ROR γ t^{pos} cells (right panel). Data are representative of four independent experiments. Percentages of each subset are indicated in quadrants.

Massot et al., Fig Sup 2

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Durant ma thèse, nous nous sommes intéressés à l'étude des cellules productrices d'IL-17 et plus particulièrement celle des lymphocytes iNKT17 mis en évidence dans le laboratoire en 2007. Les lymphocytes iNKT17 sont caractérisés par l'absence du marqueur NK1.1, l'expression du facteur de transcription ROR γ t et la production inhérente d'IL-17 (Michel et al. 2007 et 2008). Ces travaux avaient également permis de déterminer qu'il existe deux voies de différenciation thymiques bien distinctes : la première dépendante de ROR γ t et à l'origine des lymphocytes iNKT17, et la deuxième indépendante de ROR γ t durant les étapes de maturation et aboutissant à la formation des lymphocytes iNKT producteurs d'IL-4 et d'IFN- γ , cellules que nous appelons iNKT conventionnels. Les mécanismes permettant la détermination des deux embranchements n'étant pas encore connus, nous nous sommes intéressés au rôle potentiel de la protéine SAP. En effet, il est démontré que SAP est indispensable pour la sélection positive et la survie des lymphocytes iNKT DP immatures. De ce fait, comme les précédents résultats du laboratoire avaient montré que l'origine des deux voies de différenciation des cellules iNKT se situait au stade DP du développement (Michel et al. 2008), nous avons émis l'hypothèse d'un rôle prépondérant de SAP dans la détermination du lignage iNKT.

I - Rôle de SAP dans le développement des lymphocytes iNKT

Les souris transgéniques développées par Sylvain Latour et son équipe permettent de contourner l'étape de sélection impliquant les récepteurs SLAM et permettent le développement des lymphocytes iNKT en l'absence de SAP. Après avoir vérifié que les lymphocytes iNKT des souris Sap^{-/-} V α 14-Tg et Sap^{+/+} V α 14-Tg sont en proportions comparables et qu'ils sont bien fonctionnels, nous avons étudié le répertoire V β des lymphocytes iNKT. Nos résultats ont mis en évidence que les réarrangements V β du TCR des lymphocytes iNKT NK1.1^{neg} sont similaires chez les souris Sap^{-/-} V α 14-Tg et Sap^{+/+} V α 14-Tg et avec un biais généralisé en faveur de la chaîne V β 8, plutôt que les chaînes V β 2 ou V β 7, alors que les réarrangements V β du TCR des lymphocytes iNKT NK1.1^{pos} chez les Sap^{-/-} V α 14-Tg

sont anormaux indiquant que le développement et la sélection positive des lymphocytes iNKT NK1.1^{pos} chez ces souris transgéniques ne se font pas correctement (données non montrées).

Nos expériences de cultures et de stimulation cellulaires ont contribué à confirmer le fait que la protéine SAP est nécessaire au développement précoce des deux sous-populations de lymphocytes iNKT, mais ont également permis de démontrer que SAP est strictement nécessaire au développement des lymphocytes iNKT conventionnels producteurs d'IL-4, au stade précoce ainsi que lors des stades de maturation plus tardifs, alors qu'elle est dispensable au développement des lymphocytes iNKT17. SAP joue donc un rôle prépondérant dans la détermination des sous-populations de lymphocytes iNKT (**Fig.17**).

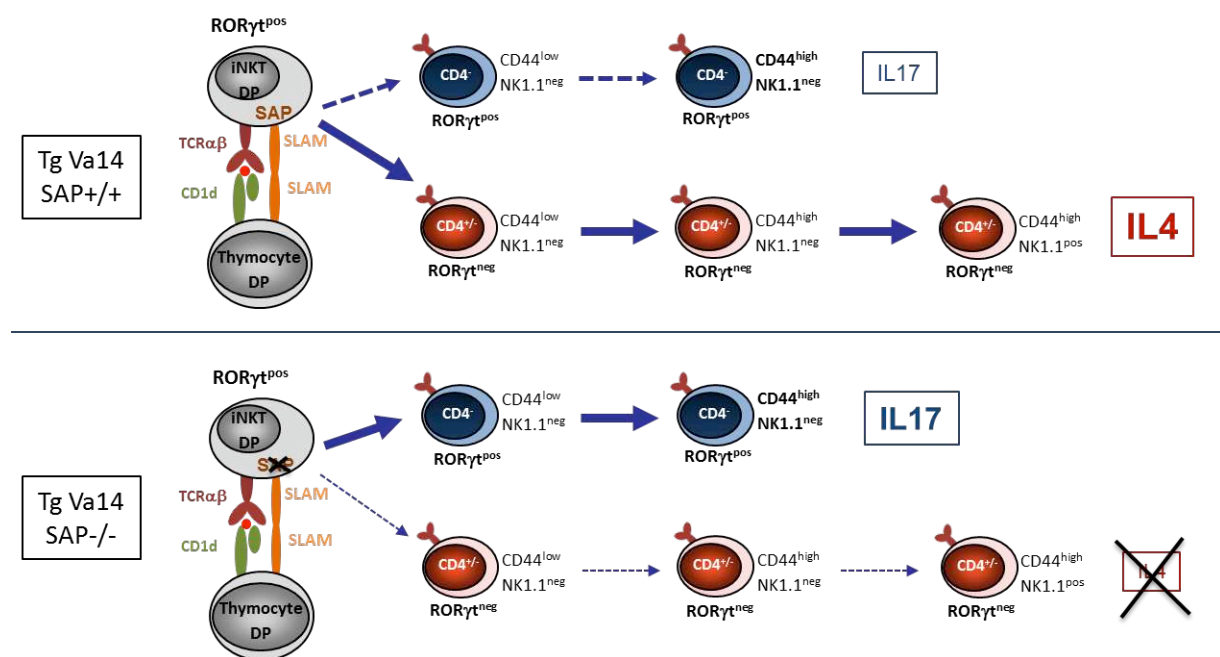


Figure 17 : Modèle d'implication différentielle de SAP dans le développement des lymphocytes iNKT. Lorsque la protéine adaptatrice SAP est présente, la différenciation des lymphocytes iNKT montre un biais vers les cellules productrices d'IL-4 et d'IFN-γ. Lorsque SAP est absente, la différenciation des cellules iNKT est biaisée en faveur du phénotype producteur d'IL-17.

Mécanismes impliqués dans la détermination des sous-populations de lymphocytes iNKT?

Intensité du signal. Les différences observées chez les souris transgéniques montrent que la présence de SAP est décisive pour la détermination de la voie empruntée par les lymphocytes iNKT DP immatures. Cela suggère que, en amont de SAP, le rôle des récepteurs SLAM est probablement également déterminant pour l'embranchement entre les sous-populations de cellules iNKT. Ainsi, on peut émettre l'hypothèse que l'intensité du signal transduit par la fixation des récepteurs SLAM lors de la sélection positive pourrait fournir une explication sur la décision de l'orientation vers la voie conventionnelle ou vers la voie annexe productrice d'IL-17. Certaines cellules iNKT suivent-elles la voie conventionnelle, lorsque le signal transduit par SLAM et SAP est fort, et la voie annexe productrice d'IL-17 lorsque le signal est faible ? L'absence de la protéine SAP entraînant une déficience sévère en lymphocytes iNKT aussi bien chez l'Homme que chez la souris (Pasquier et al. 2005 ; Nichols et al. 2005), l'existence d'un signal transmis par les récepteurs SLAM et impliquant SAP est indispensable pour la survie de ces cellules. Toutefois, l'intensité du signal pourrait varier selon le nombre de récepteurs SLAM impliqués dans la synapse immunologique entre le lymphocyte iNKT DP et le thymocyte DP lors de la sélection positive, ou encore selon que la fixation et donc le signal sont plus ou moins prolongés. Dans l'hypothèse où le signal pourrait différer selon la répartition des récepteurs parmi les sous-populations de cellules iNKT, nous avons établi un phénotype de l'expression des différents récepteurs SLAM (Ly108, Ly9, CD84, CD224, SLAM, CRACC) à la surface des cellules iNKT, selon l'idée que les lymphocytes iNKT17 pourraient exprimer préférentiellement d'autres récepteurs que ceux décrits dans la littérature (Ly108 et SLAM) (Griewank et al. 2007 ; Jordan et al. 2007). Toutefois les expériences menées sont préliminaires et ne nous ont pas encore permis d'établir un panel d'expression différentielle des récepteurs SLAM parmi les sous-populations de lymphocytes iNKT (données non montrées).

L'hypothèse émise ci-dessus peut également suggérer que l'étape de la sélection positive puisse être impliquée dans l'intensité du signal transduit par SAP. En 2006, Schümann *et al.* suggérait que le réarrangement du domaine V β détermine l'affinité du TCR pour le complexe CD1d/antigènes et influencerait ainsi la sélection positive des lymphocytes iNKT (Schümann

et al. 2006). L'affinité du TCR étant plus forte lorsque le réarrangement se fait avec la chaîne V β 7 (Bendelac et al. 2007), si les lymphocytes iNKT NK1.1^{pos} ROR γ t^{neg} expriment préférentiellement ce domaine et si les lymphocytes iNKT NK1.1^{neg} ROR γ t^{pos} expriment davantage la chaîne V β 2, chaîne la moins affine pour le CD1d, la fixation homotypique des récepteurs SLAM pourrait en être modifiée. La durée de contact pourrait alors être raccourcie dans le cas d'un réarrangement de type V β 2, le nombre de récepteurs impliqués pourrait être diminué si l'affinité du TCR pour le CD1d est faible ou le signal lui-même pourrait être plus faible. Cependant, l'analyse du répertoire V β des cellules iNKT NK1.1^{pos} ROR γ t^{neg} et NK1.1^{neg} ROR γ t^{pos} n'a pas montré de biais particulier vers une des chaînes V β 8, V β 7 ou V β 2, si ce n'est une représentation plus importante des chaînes V β 8. Ces données correspondent aux données de la littérature indiquant que les chaînes V β 8 sont les chaînes préférentiellement réarrangées par le TCR des lymphocytes iNKT.

Transduction du signal. Quelle est la nature du signal transmis par SAP ? Est-ce que ce signal induit l'inhibition directe de l'expression de ROR γ t par les lymphocytes iNKT ?, ou est-ce une action indirecte ? Quelles sont les autres molécules activées en aval de SAP potentiellement impliquées dans cette cascade ?

La tyrosine kinase Fyn est une molécule primordiale pour le développement des cellules iNKT, puisque ce processus est sévèrement bloqué chez les souris déficientes en Fyn (Eberl et al. 1999 ; Gadue et al. 1999). Cependant, l'étude de souris mutantes pour SAP, dans son domaine SH2 et plus particulièrement pour l'arginine en position 78 (SAP^{R78A}), point de fixation du domaine SH3 de Fyn, montre que la maturation des cellules iNKT n'est que partiellement bloquée en l'absence de l'interaction SAP/Fyn (Nunez-Cruz et al. 2008). Ces résultats suggèrent que les fonctions de SAP sont en partie indépendantes de Fyn, malgré le nombre réduit de cellules iNKT chez les souris mutantes SAP^{R78A}. Mais de manière intéressante, la stimulation des cellules iNKT SAP^{R78A} par l' α -GalCer, *in vitro* et *in vivo*, induit une réponse similaire aux cellules iNKT sauvages, en termes de production d'IL-4 et d'IFN- γ et d'activation des cellules NK. Cela indique que l'interaction SAP/Fyn n'est pas indispensable pour les fonctions effectrices des lymphocytes iNKT et suggère que SAP

pourrait activer une autre molécule et une autre voie parallèle à celle de Fyn. Cette idée amène une hypothèse intéressante qui est que l'effet de SAP observé sur l'acquisition fonctionnelle des lymphocytes iNKT17 et iNKT conventionnels pourrait être dû à deux voies de transduction différentes. La première voie, découlant directement des résultats de Nunez-Cruz *et al*, inclut une interaction entre SAP et une autre protéine, et conduirait au phénotype conventionnel producteur d'IL-4 et d'IFN- γ , *via* l'activation de T-bet et Gata-3 et/ou l'inhibition de ROR γ t. La deuxième voie ferait, quant à elle, intervenir l'interaction SAP/Fyn et conduirait au phénotype annexe producteur d'IL-17, *via* l'activation du facteur de transcription ROR γ t, caractéristique des cellules iNKT17, et/ou *via* l'inhibition de l'expression des facteurs de transcription T-bet et Gata-3, caractéristiques des lymphocytes iNKT conventionnels. Cette hypothèse est résumée dans la figure 18.

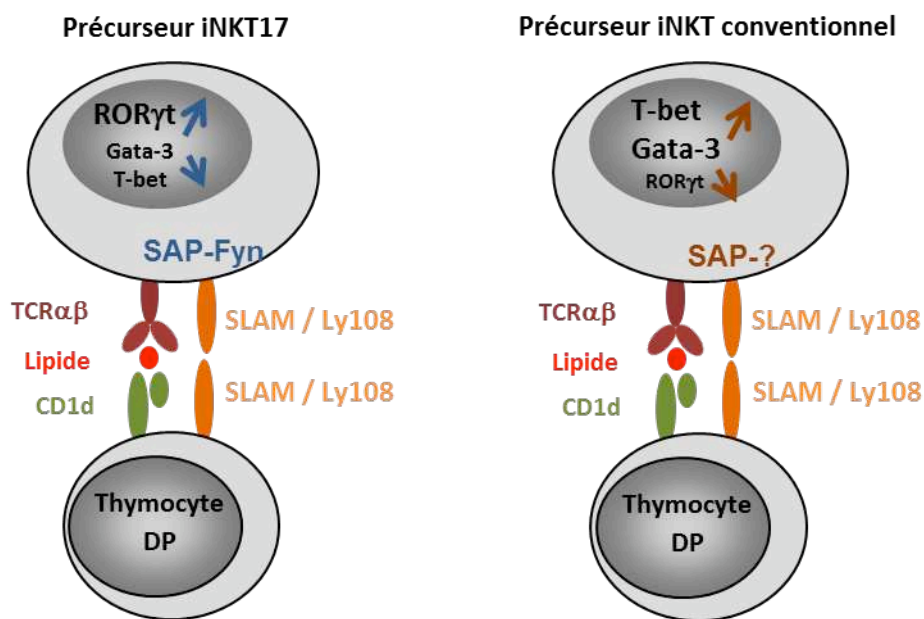


Figure 18 : Modèle d'implication différentielle de Fyn dans le développement des lymphocytes iNKT. Après l'engagement du TCR et des récepteurs SLAM et/ou Ly108, le signal est transduit vers SAP qui va alors recruter Fyn, qui favoriserait l'expression de ROR γ t, et ainsi la différenciation des précurseurs des cellules iNKT vers la voie iNKT17. Dans une voie parallèle, SAP recrute une autre molécule indéterminée qui favoriserait l'expression des facteurs de transcription T-bet et Gata-3, conduisant à la différenciation des cellules iNKT conventionnelles.

En accord avec cette hypothèse, un rapport récent montre que les souris déficientes pour Fyn ont un défaut de polarisation Th17, défaut indépendant des taux de cytokines IL-6 et TGF- β , et suggère que Fyn est requis pour la maintenance de l'expression de STAT3 lors de la différenciation Th17 (Ueda et al. 2012). De plus, le défaut de production d'IL-17 par les lymphocytes T CD4^{pos} des souris Fyn^{-/-} est associé à un défaut de l'expression précoce du facteur de transcription ROR γ t, ce qui favorise la voie de différenciation des lymphocytes T régulateurs exprimant Foxp3. Ces données suggèrent que la Src kinase Fyn, en promouvant l'expression précoce de ROR γ t, empêcherait l'expression d'autres facteurs de transcription comme Gata-3 et T-bet.

En reprenant la cascade de signalisation induite par l'activation du TCR et la liaison des récepteurs SLAM, on remarque qu'elle est directement liée avec l'activation de Fyn et du facteur de transcription NF- κ B, or il est déjà décrit dans la littérature que les signaux médiés par SAP coopèrent avec ceux émanant du TCR pour accentuer l'activation de NF- κ B (Cannons et al. 2004). D'autre part, un autre article montre que le rôle de SAP dans le développement des lymphocytes iNKT n'est pas médié par l'activation de la voie NF- κ B (Cen et al. 2009). Ces données suggèrent que si l'activation de la voie NF- κ B médiée par SAP n'est pas impliquée dans le développement, elle peut être déterminante dans la régulation de l'acquisition des propriétés fonctionnelles des lymphocytes iNKT, et notamment, en aval de Fyn, dans l'acquisition et la maintenance du phénotype IL-17.

Pourtant, l'étude des cellules iNKT chez les souris Sap^{-/-} V α 14-Tg montre une accumulation des cellules iNKT productrices d'IL-17 même en absence de SAP. Il est suggéré que Fyn pourrait également jouer un rôle indépendant de SAP dans la signalisation du TCR et lors des étapes de maturation des lymphocytes iNKT, puisqu'elle semble être la seule protéine tyrosine kinase participant efficacement à la signalisation du TCR dans ces cellules (Nunez-Cruz et al. 2008). Cependant, les mécanismes impliqués dans le recrutement et l'activation de Fyn en l'absence de SAP restent à élucider.

Voie par défaut. La production d'IL-4 et d'IFN- γ par les lymphocytes iNKT est dépendante de la présence de SAP et du signal transduit par les récepteurs SLAM (Cen et al. 2009). Ce rapport conduit à une hypothèse intéressante selon laquelle le développement des

lymphocytes iNKT serait déterminé vers la voie iNKT17 par défaut, avant la sélection positive, et serait détourné vers la voie conventionnelle en présence d'un signal fort émis par la voie SLAM/SAP ? Cette hypothèse est à mettre en relation avec l'idée que la décision du lignage IL-17 ou IL-4/IFN- γ est dépendante de l'intensité du signal transmis par les récepteurs SLAM. Ainsi, un faible signal transmis par les récepteurs SLAM associé à une signalisation intracellulaire médiée par SAP et Fyn favoriserait le maintien du phénotype fonctionnel IL-17, alors qu'un fort signal transmis par les récepteurs SLAM associé à une signalisation intracellulaire médiée par SAP et un autre facteur, inhiberait l'expression du facteur de transcription ROR γ t et induirait l'expression des facteurs impliqués dans la voie fonctionnelle IL-4 / IFN- γ (**Fig. 19**).

Nos résultats découlent d'expériences dans lesquelles la protéine SAP est absente. Que se passerait-il si l'expression de SAP était augmentée ? Notre hypothèse est que l'expression forcée de SAP entraînerait une diminution du nombre de lymphocytes iNKT producteurs d'IL-17 en faveur des lymphocytes iNKT conventionnels producteurs d'IL-4 et d'IFN- γ . Pour étudier cette théorie, l'équipe de Sylvain Latour est en train de développer des souris transgéniques pour SAP, dont l'expression est alors fortement accrue. Les résultats préliminaires sur les différents organes lymphoïdes, comprenant le thymus, la rate et les ganglions périphériques, ne permettent pour l'instant pas d'établir une quelconque réponse à cette hypothèse.

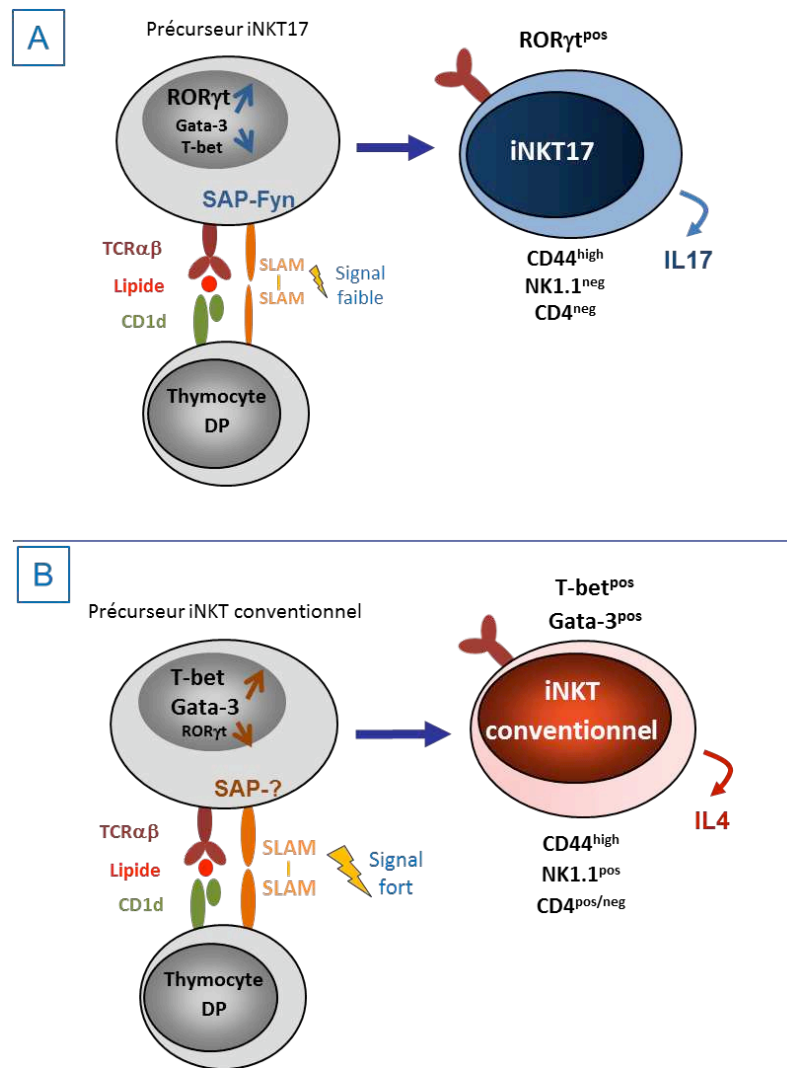


Figure 19 : Modèle de différenciation des sous-populations de lymphocytes iNKT. (A) Après l'engagement du TCR et des récepteurs SLAM, le signal faible est transduit vers SAP qui va alors recruter Fyn, qui favoriserait l'expression de ROR γ t, et ainsi la différenciation des précurseurs des cellules iNKT vers la voie iNKT17. (B) Dans une voie parallèle, le signal transduit par les récepteurs SLAM vers SAP est fort, SAP recrute une autre molécule indéterminée qui favoriserait l'expression des facteurs de transcription T-bet et Gata-3, conduisant à la différenciation des cellules iNKT conventionnelles.

II - Les lymphocytes Th17 naturels produisent rapidement de l'IL-17 et de l'IL-22 en réponse à des stimuli pro-inflammatoires

Nos études sur les lymphocytes iNKT et l'IL-17 dans les divers organes lymphoïdes primaire et secondaires murins nous ont permis de détecter une population T CD4^{pos} RORγt^{pos} mature et fonctionnelle aussi bien au niveau du thymus qu'en périphérie. Cette population montre les mêmes caractéristiques que les lymphocytes Th17 induits activés, elle est présente dans de nombreux organes, elle produit de fortes quantités d'IL-17 en réponse à une stimulation du TCR et à une stimulation par la PMA + ionomycine. De plus, la stimulation en présence d'IL-23 et d'IL-1β a permis de montrer deux caractéristiques de cette population, sa capacité à produire à la fois de l'IL-22 et de l'IL-17 et sa capacité à répondre aux stimuli pro-inflammatoires.

Lymphocytes Th17 naturels ?

Le terme "naturel" est un terme controversé dans le monde des lymphocytes T. Le faible nombre de publications et la connaissance d'une migration tardive des lymphocytes T vers le thymus une fois qu'ils ont été activés sont en défaveur de cette idée. Cependant, nos résultats tendent à montrer que les lymphocytes Th17 naturels sont une population cellulaire distincte de celle des lymphocytes Th17 induits ou conventionnels.

En effet, ces cellules sont présentes et fonctionnelles au niveau du thymus de jeunes souris, âgées de 4 à 6 semaines maximum, cela permet d'éviter autant que possible la migration des cellules T matures/effectrices de la périphérie vers le thymus. De plus, après le transfert adoptif de cellules T naïves à des souris *RAG*^{-/-} Ly5.1^{pos}, nous n'avons détecté aucune cellule T Ly5.1^{neg} au niveau du thymus (données non montrées), ce qui suggère que le phénomène de migration de la périphérie vers le thymus est un phénomène rare et/ou dépendant de conditions très particulières.

Confirmer l'existence des lymphocytes Th17 naturels par une caractérisation évolutive précise devient alors un objectif primordial. Une expérience importante serait d'établir une

cinétique d'apparition des lymphocytes Th17 notamment au moyen des souris transgéniques ROR γ t-Gfp. Ainsi il serait utile d'étudier la présence des lymphocytes nTh17 dans le thymus fœtal, puis durant les semaines suivant la naissance. Le suivi de migration des cellules vers la périphérie est également important, notamment dans les ganglions lymphoïdes, la rate et le foie. L'emploi de souris transgéniques pour un anticorps anti-CD4 (GK), délétant continuellement les lymphocytes T CD4^{pos} dans la périphérie mais n'affectant pas le thymus, a permis de caractériser les lymphocytes T régulateurs naturels, cela permettrait également une étude efficace des lymphocytes Th17 naturels au niveau du thymus (Zhan et al. 2007).

Si la présence naturelle des lymphocytes Th17 dans le thymus est contestable, l'expression différentielle du facteur de transcription PLZF, l'absence de réponse aux cytokines au niveau des intestins et la présence de lymphocytes T producteurs d'IL-17 chez les souris déficientes en IL-6 sont bien en faveur de l'existence de deux populations bien distinctes de lymphocytes Th17, les cellules naturelles et les cellules induites.

Développement des lymphocytes Th17 naturels

Nos résultats montrent que le développement des lymphocytes Th17 induits et des lymphocytes Th17 naturels ont des similarités puisqu'ils expriment de la même manière le facteur de transcription ROR γ t, indispensable à la production d'IL-17, et le marqueur d'activation CD44.

Cependant nous avons également décrit des différences importantes. La première réside dans le rôle de la flore intestinale, dont dépendent les lymphocytes Th17 induits. Bien que nous n'ayons pas observé de cellule T CD4^{pos} productrice d'IL-17 dans les intestins des souris axéniques (Lochner et al. 2011) (données non montrées), le thymus de ces souris a montré des pourcentages en cellules T CD4^{pos} CD44^{hi} ROR γ t^{pos} équivalents à ceux des souris sauvages, démontrant que le développement des lymphocytes Th17 naturels n'est pas dépendant de la flore intestinale. La deuxième différence réside dans le rôle essentiel d'une cytokine pro-inflammatoire, l'IL-6, lors de la différenciation des lymphocytes iTh17 au niveau

de la lamina propria (Ivanov et al. 2006), alors que les lymphocytes nTh17 se développent normalement dans le thymus des souris déficientes en IL-6 (Cf Résultats ; Tanaka et al. 2009).

Chez l'Homme, il a été rapporté que les lymphocytes T naïfs issus du sang de cordon des nouveaux-nés prématurés ou à terme sont pré-programmés avec un biais en faveur d'une différenciation de type Th17, puisqu'ils ont des taux d'expression élevés du récepteur de l'IL-23 et du TGF- β , et des facteurs de transcription STAT3 et RORC (Black et al. 2012). Ces résultats suggèrent que la différenciation des lymphocytes Th17 peut également être très précoce chez l'Homme, et que, sans être réellement des cellules T innées, ces cellules pourraient répondre rapidement aux stimulations antigéniques et/ou aux stimulations cytokiniques, puisqu'elles expriment des taux élevés de récepteur de l'IL-23.

Nous avons montré que les cellules nTh17 diffèrent des cellules Th17 conventionnelles par leur capacité rapide d'activation et leur capacité à répondre aux stimuli pro-inflammatoires. On peut donc faire un rapprochement conséquent entre les cellules iNKT, les lymphocytes $T\gamma\delta$ et les lymphocytes Th17 naturels que nous décrivons ici. Le développement des cellules iNKT est contrôlé par de nombreux facteurs, comme nous l'avons décrit dans l'introduction, et notamment par le facteur de transcription PLZF. Or nous proposons ici que PLZF associé à ROR γ t soient des marqueurs permettant la distinction des lymphocytes Th17 naturels des lymphocytes Th17 induits. PLZF pourrait-il être impliqué d'une quelconque manière dans le développement de ces trois populations de cellules T ayant des caractéristiques innées ? PLZF a déjà été décrit comme un facteur responsable du développement des propriétés de réponse innée des lymphocytes iNKT (Savage et al. 2008 ; Kovalovsky et al. 2008) et des lymphocytes $T\gamma\delta$ (Kreslavsky et al. 2009), permettant une production rapide de cytokines et une capacité de produire simultanément des cytokines de type Th1 (IFN- γ) et de type Th2 (IL-4). Des propriétés équivalentes du PLZF ont également été décrites sur les cellules T CD4⁺ décrites comme naïves, mais capables de répondre en l'absence d'une interaction TCR-antigène (Savage et al. 2011). Il semble alors très probable que PLZF soit également responsable des propriétés de réponse innée des lymphocytes Th17 naturels. Sans être nécessairement directement impliqué dans la production d'IL-17 et d'IL-22 par ces cellules, il pourrait favoriser ce phénotype fonctionnel, en agissant de façon synergique avec les

facteurs de transcription ROR γ t ou STAT3. PLZF serait donc un marqueur caractéristique des cellules T innées productrices d'IL-17.

L'IL-23 a un rôle primordial dans la survie, la maintenance de la lignée et l'expansion clonale des lymphocytes Th17 induits (Aggarwal et al. 2003 ; Veldhoen et al. 2006 ; McGeachy et Cua. 2008). Peut-elle aussi avoir un rôle plus précoce, c'est-à-dire un rôle dans le développement des lymphocytes Th17 naturels puis dans la maintenance de ces cellules ? Les souris déficientes en IL-23 présentent des lymphocytes Th17 naturels au niveau du thymus, toutefois leur production d'IL-17 en réponse à une stimulation du TCR est réduite de moitié (Tanaka et al. 2009), suggérant que le rôle de l'IL-23 est limité à la régulation des propriétés fonctionnelles et non au développement des lymphocytes nTh17.

Il est également fortement suggéré que les différentes populations T productrices d'IL-17 requièrent différents signaux du TCR et/ou des voies de transduction dépendantes de cytokine diverses pour la différenciation du lignage IL-17^{pos}. Pour exemple, l'absence de TGF- β conduit à un phénotype fortement pathogénique des lymphocytes Th17 induits (Ghoreschi et al. 2010), le développement des lymphocytes Tgd producteurs d'IL-17 est dépendants des facteurs de transcription RelA et RelB (Powolny-Budnicka et al. 2011) et les lymphocytes nTh17 ne nécessitent pas d'IL-6 pour leur développement (Cf Résultats ; Tanaka et al. 2009). Cela suggère qu'il existe de nombreux mécanismes permettant le développement et l'activation des cellules productrices d'IL-17.

Fonctions des lymphocytes Th17 naturels

Les cellules nTh17 que nous décrivons ici diffèrent des lymphocytes iTh17 par leur capacité rapide d'activation et leur capacité à répondre à des stimuli pro-inflammatoires n'impliquant pas le TCR, ce qui est classiquement le cas pour des lymphocytes T helper. Ainsi du point de vue fonctionnel, ces cellules se rapprochent des cellules T de l'immunité innée, c'est-à-dire des cellules iNKT et des lymphocytes T $\gamma\delta$.

Du fait de la production rapide de cytokines comme l'IL-17 et l'IL-22, les cellules nTh17 peuvent avoir un rôle de soutien pour le système immunitaire inné, à savoir répondre immédiatement aux stimuli lancés par les macrophages ou les cellules dendritiques en cas d'infection bactérienne par *C. Rodentium* ou *S. Typhimurium* par exemple. Ou encore, elles pourraient avoir un rôle de préparation à la réponse immune adaptative, c'est-à-dire agir comme « éclaireurs » et faciliter la mise en place de la réponse cellulaire T adaptative induite par l'infection. Ainsi elles permettraient d'apporter une fonction non redondante aux défenses de l'hôte contre des pathogènes. Cependant, du point de vue auto-immun, la présence de deux types cellulaires aux propriétés très proches, notamment par la production commune d'IL-17, pourraient amplifier les effets délétères. Ainsi, l'existence de lymphocytes Th17 naturels chez les souris déficientes en IL-6 pourrait expliquer que la déficience en IL-17 ait un impact plus important sur le développement de l'EAE, que la déficience en IL-6 qui ne fournit qu'une protection partielle (Korn et al. 2007).

Nos résultats ne permettent pas d'évaluer les capacités prolifératives des lymphocytes Th17 naturels, subséquentes à l'activation, toutefois le temps de réponse très court suppose ici une prolifération faible de ces cellules. Un rapport a ainsi montré que l'acquisition des propriétés effectrices ou mémoires par les lymphocytes T CD4^{pos} sous l'influence du PLZF, n'est pas associée avec une phase de prolifération cellulaire comme cela peut-être le cas avec des lymphocytes T conventionnels (Kovalovsky et al. 2010).

Les antigènes reconnus par les lymphocytes nTh17 et les iTh17 sont certainement différents puisque la première sous-population, auto-réactive, reconnaît des antigènes du soi alors que la deuxième reconnaît davantage des antigènes issus de pathogènes extracellulaires. Ainsi les lymphocytes Th17 naturels pourraient jouer un rôle dans la régulation de la protéine « thymic stromal lymphopoietin » (TSLP), cytokine apparentée à l'IL-7 et produite en réponse à des facteurs endogènes et/ou environnementaux. TSLP est très fortement exprimée dans les lésions de la peau de patients atteints de dermatite atopique et représente un facteur critique à l'interface entre le corps et l'environnement (Takai. 2012). L'équipe de V. Soumelis a très récemment montré que l'IL-17A, en particulier, mais également les autres cytokines produites par les lymphocytes Th17, inhibent le développement des cellules Th2 induites par les DCs activées par la TSLP. De fait l'IL-17A inhibe la production de TSLP, ce qui bloque en

réalité très en amont la voie de signalisation menant au développement des lymphocytes Th2 (Bogiatzi et al. 2012, JACI). Cela expliquerait, au moins en partie, pourquoi les patients atteints de maladie auto-immune développent moins d'allergie que les individus sains.

La production d'IL-17 et d'IL-22 semble très contrôlée dans le sens où l'IL-17 est produite après une stimulation simple du TCR, alors que l'IL-22 nécessite la présence d'agents pro-inflammatoires. Par ailleurs, la stimulation avec du LPS des BMDCs induit ensuite une production massive d'IL-22 (environ 25%) et d'IL-17 plus IL-22 (environ 25%) alors que seulement un faible pourcentage produit seulement de l'IL-17 (moins de 5%). Les conditions environnementales sont donc primordiales dans les rôles que peuvent jouer les lymphocytes nTh17 au cours de processus immunitaires. La stimulation par des cytokines IL-23 et IL-1 β exogènes sur ces cellules dans les mêmes conditions que pour les surnageants de BMDCs stimulées avec le LPS, a induit une réponse plus faible des lymphocytes nTh17. Cela indique que l'activation des nTh17 passe par l'IL-23 et l'IL-1 β mais que les produits des cellules dendritiques contiennent d'autres facteurs agissant en synergie avec les cytokines pro-inflammatoires (notamment l'IFN de type I, l'IFN- α ...)

Enfin, un récent papier a montré que l'interleukine 22 produite par les LTi ROR γ ^{pos} CCR6^{pos} NKp46^{neg} pouvait avoir un rôle de régénération des cellules épithéliales thymiques, en promouvant leur prolifération et leur survie en réponse à un stress aigu, comme une irradiation sublétales (Dudakov et al. 2012). En effet, cette cytokine montre, au niveau du thymus, les mêmes propriétés fonctionnelles que dans les intestins où elle a un rôle très important dans la régénération de la barrière muqueuse (Pickert et al. 2009 ; Sugimoto et al. 2008 ; Zenewicz et al. 2008). Ces résultats sont très importants mis en relation avec les nôtres, car outre le fait que cela confirme la production possible d'IL-22 dans le thymus, ils donnent une piste sur l'intérêt de développer des cellules T naturelles.

Existence de niches fonctionnelles

Nos résultats montrent clairement l'existence d'une répartition tissulaire différentielle des cellules productrices d'IL-17 et d'IL-22. En effet, les lymphocytes Th17 naturels que nous décrivons ici sont fortement représentés dans les ganglions périphériques, et présents dans le thymus et plus faiblement dans la rate. De manière intéressante, ils sont complètement absents des intestins, organes pourtant riches en lymphocytes Th17 induits. Cela suggère fortement l'existence de niches cellulaires. Le développement de ces niches pourrait être dû aux productions différentielles d'IL-17 et d'IL-22. En effet, les intestins sont très riches en IL-17 (Eberl. 2012), cytokine pro-inflammatoire, alors que les lymphocytes Th17 naturels décrits ici semblent être de plus gros producteurs d'IL-22 (50%) que d'IL-17 (25%). L'IL-22 étant une cytokine très importante au niveau de la peau (Ouyang. 2010), notamment pour ses fonctions de régénération tissulaire et anti-microbiennes, les lymphocytes Th17 naturels pourraient y être fortement représentés et jouer un rôle critique dans les mécanismes mis en jeu. Ainsi, nos résultats et nos connaissances sur les lymphocytes Th17 suggèrent que les lymphocytes Th17 induits seraient présents dans les intestins alors que les lymphocytes Th17 naturels seraient présents au niveau de la peau (**Fig. 20**). Pour aller plus loin, on pourrait également avoir une représentation préférentielle des lymphocytes iTh17 dans la rate alors que les lymphocytes nTh17 sont plus fréquents dans les ganglions périphériques. Il serait réellement très intéressant de pousser les recherches de ce côté-là, notamment sur les zones soumises à des lésions récurrentes, comme chez les patients atteints de psoriasis. L'identification des différents lymphocytes Th17 par les marqueurs ROR γ t et du PLZF pourrait permettre une étude plus aisée du rôle précis des lymphocytes Th17 naturels et des lymphocytes Th17 induits dans les différents organes.

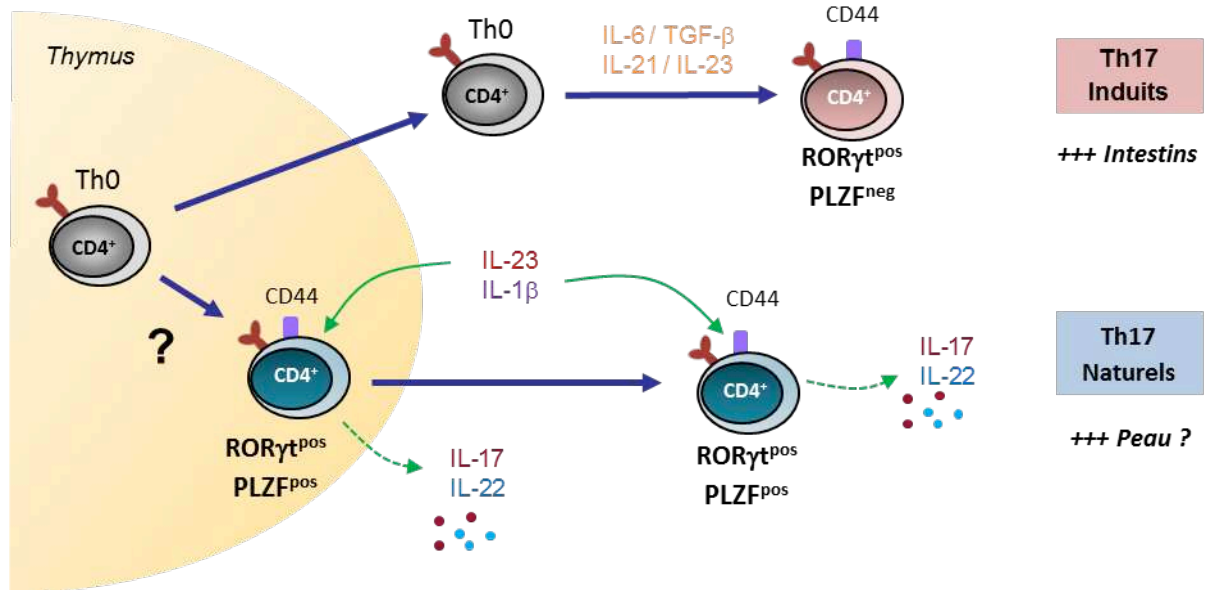


Figure 20 : Représentation des lymphocytes Th17 induits et naturels. Les lymphocytes Th17 se différencient au niveau du thymus et expriment les facteurs de transcription RORγt et PLZF. Ils sont fonctionnels dès le thymus et répondent directement à des stimuli pro-inflammatoires. Les lymphocytes Th17 induits se différencient en périphérie, expriment le facteur de transcription RORγt mais pas PLZF.

En conclusion, nos résultats nous ont permis de montrer que SAP est indispensable pour l'acquisition de la capacité de production d'IL-4, mais n'est pas strictement nécessaire pour l'acquisition des propriétés fonctionnelles des lymphocytes iNKT17. Cela nous permet d'établir que SAP est un point de contrôle obligatoire déterminant l'orientation de la différenciation thymique des cellules iNKT vers les cellules iNKT17 ou vers les cellules iNKT conventionnelles. Nous avons ainsi pu développer un modèle de différenciation thymique des lymphocytes iNKT17 et des lymphocytes iNKT conventionnelles, dans lequel les récepteurs SLAM et la protéine SAP en sont des acteurs primordiaux.

Notre étude sur les lymphocytes iNKT17 nous ont permis de mettre en évidence une population thymique de lymphocytes Th17 naturels matures. Ces lymphocytes ont des capacités de réponse de type inné, puisqu'ils produisent rapidement et massivement de l'IL-17 et de l'IL-22 en réponse à des stimuli pro-inflammatoires. Nous avons également pu définir un marqueur, le facteur PLZF, qui, associé au facteur RORγt, permet de les distinguer des lymphocytes Th17 conventionnels.

Ces résultats ouvrent donc de nombreuses perspectives de recherches fondamentale et thérapeutique, domaine dans lequel l'IL-17 est devenu une cible privilégiée pour le traitement des maladies auto-immunes.

BIBLIOGRAPHIE

- Afkarian, M., J. R. Sedy, et al. (2002). "T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells." *Nat Immunol* **3**(6): 549-557.
- Akbari, O., P. Stock, et al. (2003). "Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity." *Nat Med* **9**(5): 582-588.
- Allende, M. L., D. Zhou, et al. (2008). "S1P1 receptor expression regulates emergence of NKT cells in peripheral tissues." *FASEB J* **22**(1): 307-315.
- Amsen, D., C. G. Spilianakis, et al. (2009). "How are T(H)1 and T(H)2 effector cells made?" *Curr Opin Immunol* **21**(2): 153-160.
- Andoh, A., Z. Zhang, et al. (2005). "Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts." *Gastroenterology* **129**(3): 969-984.
- Annunziato, F., L. Cosmi, et al. (2007). "Phenotypic and functional features of human Th17 cells." *J Exp Med* **204**(8): 1849-1861.
- Au-Yeung, B. B. and D. J. Fowell (2007). "A key role for Itk in both IFN gamma and IL-4 production by NKT cells." *J Immunol* **179**(1): 111-119.
- Batten, M., J. Li, et al. (2006). "Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells." *Nat Immunol* **7**(9): 929-936.
- Baxter, A. G., S. J. Kinder, et al. (1997). "Association between alphabetaTCR+CD4-CD8- T-cell deficiency and IDDM in NOD/Lt mice." *Diabetes* **46**(4): 572-582.
- Bendelac, A. (1995). "Mouse NK1+ T cells." *Curr Opin Immunol* **7**(3): 367-374.
- Bendelac, A. (1995). "Positive selection of mouse NK1+ T cells by CD1-expressing cortical thymocytes." *J Exp Med* **182**(6): 2091-2096.
- Bendelac, A., O. Lantz, et al. (1995). "CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes." *Science* **268**(5212): 863-865.
- Bendelac, A., P. B. Savage, et al. (2007). "The biology of NKT cells." *Annu Rev Immunol* **25**: 297-336.
- Bendelac, A., R. D. Hunziker, et al. (1996). "Increased interleukin 4 and immunoglobulin E production in transgenic mice overexpressing NK1 T cells." *J Exp Med* **184**(4): 1285-1293.
- Benlagha, K., T. Kyn, et al. (2002). "A thymic precursor to the NK T cell lineage." *Science* **296**(5567): 553-555.
- Benlagha, K., D. G. Wei, et al. (2005). "Characterization of the early stages of thymic NKT cell development." *J Exp Med* **202**(4): 485-492.

- Berzins, S. P., F. W. McNab, et al. (2006). "Long-term retention of mature NK1.1+ NKT cells in the thymus." *J Immunol* **176**(7): 4059-4065.
- Besnard, A. G., R. Sabat, et al. (2011). "Dual Role of IL-22 in allergic airway inflammation and its cross-talk with IL-17A." *Am J Respir Crit Care Med* **183**(9): 1153-1163.
- Bettelli, E., Y. Carrier, et al. (2006). "Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells." *Nature* **441**(7090): 235-238.
- Bezbradica, J. S., L. E. Gordy, et al. (2006). "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor regulates effector differentiation of invariant natural killer T cells during thymic ontogeny." *Immunity* **25**(3): 487-497.
- Biswas, P. S., S. Gupta, et al. (2010). "Phosphorylation of IRF4 by ROCK2 regulates IL-17 and IL-21 production and the development of autoimmunity in mice." *J Clin Invest* **120**(9): 3280-3295.
- Bogiatzi, S. I., M. Guillot-Delost, et al. (2012). "Multiple-checkpoint inhibition of thymic stromal lymphopoietin-induced T(H)2 response by T(H)17-related cytokines." *J Allergy Clin Immunol* **130**(1): 233-240 e235.
- Boniface, K., F. X. Bernard, et al. (2005). "IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes." *J Immunol* **174**(6): 3695-3702.
- Borowski, C. and A. Bendelac (2005). "Signaling for NKT cell development: the SAP-FynT connection." *J Exp Med* **201**(6): 833-836.
- Brand, S., F. Beigel, et al. (2006). "IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **290**(4): G827-838.
- Brennan, P. J., R. V. Tatituri, et al. (2011). "Invariant natural killer T cells recognize lipid self antigen induced by microbial danger signals." *Nat Immunol* **12**(12): 1202-1211.
- Brigl, M. and M. B. Brenner (2010). "How invariant natural killer T cells respond to infection by recognizing microbial or endogenous lipid antigens." *Semin Immunol* **22**(2): 79-86.
- Brigl, M., L. Bry, et al. (2003). "Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection." *Nat Immunol* **4**(12): 1230-1237.
- Brigl, M., R. V. Tatituri, et al. (2011). "Innate and cytokine-driven signals, rather than microbial antigens, dominate in natural killer T cell activation during microbial infection." *J Exp Med* **208**(6): 1163-1177.
- Brustle, A., S. Heink, et al. (2007). "The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4." *Nat Immunol* **8**(9): 958-966.
- Budd, R. C., G. C. Miescher, et al. (1987). "Developmentally regulated expression of T cell receptor beta chain variable domains in immature thymocytes." *J Exp Med* **166**(2): 577-582.
- Bullens, D. M., E. Truyen, et al. (2006). "IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx?" *Respir Res* **7**: 135.

- Cannons, J. L., L. J. Yu, et al. (2004). "SAP regulates T(H)2 differentiation and PKC-theta-mediated activation of NF-kappaB1." *Immunity* **21**(5): 693-706.
- Carpenter, A. C. and R. Bosselut (2010). "Decision checkpoints in the thymus." *Nat Immunol* **11**(8): 666-673.
- Cascao, R., B. Vidal, et al. (2012). "Effective treatment of rat adjuvant-induced arthritis by celastrol." *Autoimmun Rev.*
- Castillo, E. F., L. F. Acero, et al. (2010). "Thymic and peripheral microenvironments differentially mediate development and maturation of iNKT cells by IL-15 transpresentation." *Blood* **116**(14): 2494-2503.
- Cella, M., A. Fuchs, et al. (2009). "A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity." *Nature* **457**(7230): 722-725.
- Cen, O., A. Ueda, et al. (2009). "The adaptor molecule signaling lymphocytic activation molecule-associated protein (SAP) regulates IFN-gamma and IL-4 production in V alpha 14 transgenic NKT cells via effects on GATA-3 and T-bet expression." *J Immunol* **182**(3): 1370-1378.
- Cerundolo, V., J. D. Silk, et al. (2009). "Harnessing invariant NKT cells in vaccination strategies." *Nat Rev Immunol* **9**(1): 28-38.
- Chaidos, A., S. Patterson, et al. (2012). "Graft invariant natural killer T-cell dose predicts risk of acute graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation." *Blood*.
- Chang, W. S., J. Y. Kim, et al. (2008). "Cutting edge: Programmed death-1/programmed death ligand 1 interaction regulates the induction and maintenance of invariant NKT cell anergy." *J Immunol* **181**(10): 6707-6710.
- Chen, W., W. Jin, et al. (2003). "Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3." *J Exp Med* **198**(12): 1875-1886.
- Cherrier, M., C. Ohnmacht, et al. (2012). "Development and function of intestinal innate lymphoid cells." *Curr Opin Immunol*.
- Christiansen, D., J. Milland, et al. (2008). "Humans lack iGb3 due to the absence of functional iGb3-synthase: implications for NKT cell development and transplantation." *PLoS Biol* **6**(7): e172.
- Chun, T., M. J. Page, et al. (2003). "CD1d-expressing dendritic cells but not thymic epithelial cells can mediate negative selection of NKT cells." *J Exp Med* **197**(7): 907-918.
- Chung, Y., X. Yang, et al. (2006). "Expression and regulation of IL-22 in the IL-17-producing CD4+ T lymphocytes." *Cell Res* **16**(11): 902-907.
- Ciric, B., M. El-behi, et al. (2009). "IL-23 drives pathogenic IL-17-producing CD8+ T cells." *J Immunol* **182**(9): 5296-5305.
- Coles, M. C. and D. H. Raulet (2000). "NK1.1+ T cells in the liver arise in the thymus and are selected by interactions with class I molecules on CD4+CD8+ cells." *J Immunol* **164**(5): 2412-2418.

- Colonna, M. (2009). "Interleukin-22-producing natural killer cells and lymphoid tissue inducer-like cells in mucosal immunity." *Immunity* **31**(1): 15-23.
- Crowe, N. Y., A. P. Uldrich, et al. (2003). "Glycolipid antigen drives rapid expansion and sustained cytokine production by NK T cells." *J Immunol* **171**(8): 4020-4027.
- Cua, D. J. and C. M. Tato (2010). "Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system." *Nat Rev Immunol* **10**(7): 479-489.
- Cui, J., T. Shin, et al. (1997). "Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors." *Science* **278**(5343): 1623-1626.
- Czar, M. J., E. N. Kersh, et al. (2001). "Altered lymphocyte responses and cytokine production in mice deficient in the X-linked lymphoproliferative disease gene SH2D1A/DSHP/SAP." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(13): 7449-7454.
- Das, J., G. Ren, et al. (2009). "Transforming growth factor beta is dispensable for the molecular orchestration of Th17 cell differentiation." *J Exp Med* **206**(11): 2407-2416.
- Diana, J., T. Griseri, et al. (2009). "NKT cell-plasmacytoid dendritic cell cooperation via OX40 controls viral infection in a tissue-specific manner." *Immunity* **30**(2): 289-299.
- Doisne, J. M., L. Bartholin, et al. (2009). "iNKT cell development is orchestrated by different branches of TGF-beta signaling." *J Exp Med* **206**(6): 1365-1378.
- Doisne, J. M., C. Becourt, et al. (2009). "Skin and peripheral lymph node invariant NKT cells are mainly retinoic acid receptor-related orphan receptor (gamma)t+ and respond preferentially under inflammatory conditions." *J Immunol* **183**(3): 2142-2149.
- Doisne, J. M., V. Soulard, et al. (2011). "Cutting edge: crucial role of IL-1 and IL-23 in the innate IL-17 response of peripheral lymph node NK1.1- invariant NKT cells to bacteria." *J Immunol* **186**(2): 662-666.
- Dudakov, J. A., A. M. Hanash, et al. (2012). "Interleukin-22 drives endogenous thymic regeneration in mice." *Science* **336**(6077): 91-95.
- Duhen, T., R. Geiger, et al. (2009). "Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells." *Nat Immunol* **10**(8): 857-863.
- Eberl, G. (2012). "Development and evolution of RORgammat+ cells in a microbe's world." *Immunol Rev* **245**(1): 177-188.
- Eberl, G., B. Lowin-Kropf, et al. (1999). "Cutting edge: NKT cell development is selectively impaired in Fyn- deficient mice." *J Immunol* **163**(8): 4091-4094.
- Egawa, T., G. Eberl, et al. (2005). "Genetic evidence supporting selection of the Valpha14i NKT cell lineage from double-positive thymocyte precursors." *Immunity* **22**(6): 705-716.
- Exley, M. A., L. Lynch, et al. (2011). "Developing understanding of the roles of CD1d-restricted T cell subsets in cancer: reversing tumor-induced defects." *Clin Immunol* **140**(2): 184-195.

- Eyerich, S., K. Eyerich, et al. (2010). "IL-17 and IL-22: siblings, not twins." *Trends Immunol* **31**(9): 354-361.
- Faveeuw, C., V. Angeli, et al. (2002). "Antigen presentation by CD1d contributes to the amplification of Th2 responses to *Schistosoma mansoni* glycoconjugates in mice." *J Immunol* **169**(2): 906-912.
- Finkelman, F. D., S. P. Hogan, et al. (2010). "Importance of cytokines in murine allergic airway disease and human asthma." *J Immunol* **184**(4): 1663-1674.
- Fowlkes, B. J., A. M. Kruisbeek, et al. (1987). "A novel population of T-cell receptor alpha beta-bearing thymocytes which predominantly expresses a single V beta gene family." *Nature* **329**(6136): 251-254.
- Fox, C. J., P. S. Hammerman, et al. (2005). "Fuel feeds function: energy metabolism and the T-cell response." *Nat Rev Immunol* **5**(11): 844-852.
- Fox, L. M., D. G. Cox, et al. (2009). "Recognition of lyso-phospholipids by human natural killer T lymphocytes." *PLoS Biol* **7**(10): e1000228.
- Franki, A. S., K. Van Beneden, et al. (2006). "A unique lymphotoxin {alpha}beta-dependent pathway regulates thymic emigration of V{alpha}14 invariant natural killer T cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(24): 9160-9165.
- Funakoshi, T., K. Yamashita, et al. (2012). "A novel NF-kappaB inhibitor, dehydroxymethylepoxyquinomicin, ameliorates inflammatory colonic injury in mice." *J Crohns Colitis* **6**(2): 215-225.
- Gadue, P., N. Morton, et al. (1999). "The Src family tyrosine kinase Fyn regulates natural killer T cell development." *J Exp Med* **190**(8): 1189-1196.
- Gaffen, S. L. (2009). "Structure and signalling in the IL-17 receptor family." *Nat Rev Immunol* **9**(8): 556-567.
- Gapin, L., J. L. Matsuda, et al. (2001). "NKT cells derive from double-positive thymocytes that are positively selected by CD1d." *Nat Immunol* **2**(10): 971-978.
- Gaspar, H. B., R. Sharifi, et al. (2002). "X-linked lymphoproliferative disease: clinical, diagnostic and molecular perspective." *Br J Haematol* **119**(3): 585-595.
- Geddes, K., S. J. Rubino, et al. (2011). "Identification of an innate T helper type 17 response to intestinal bacterial pathogens." *Nat Med* **17**(7): 837-844.
- Geyer, M. and U. Muller-Ladner (2010). "Actual status of antiinterleukin-1 therapies in rheumatic diseases." *Curr Opin Rheumatol* **22**(3): 246-251.
- Ghoreschi, K., A. Laurence, et al. (2010). "Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling." *Nature* **467**(7318): 967-971.
- Godfrey, D. I., H. R. MacDonald, et al. (2004). "NKT cells: what's in a name?" *Nat Rev Immunol* **4**(3): 231-237.

- Godinez, I., M. Raffatellu, et al. (2009). "Interleukin-23 orchestrates mucosal responses to Salmonella enterica serotype Typhimurium in the intestine." *Infect Immun* **77**(1): 387-398.
- Gombert, J. M., A. Herbelin, et al. (1996). "Early quantitative and functional deficiency of NK1+-like thymocytes in the NOD mouse." *Eur J Immunol* **26**(12): 2989-2998.
- Gombert, J. M., A. Herbelin, et al. (1996). "Early defect of immunoregulatory T cells in autoimmune diabetes." *C R Acad Sci III* **319**(2): 125-129.
- Goto, M., M. Murakawa, et al. (2009). "Murine NKT cells produce Th17 cytokine interleukin-22." *Cell Immunol* **254**(2): 81-84.
- Griewank, K., C. Borowski, et al. (2007). "Homotypic interactions mediated by Slamf1 and Slamf6 receptors control NKT cell lineage development." *Immunity* **27**(5): 751-762.
- Gumperz, J. E., S. Miyake, et al. (2002). "Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining." *J Exp Med* **195**(5): 625-636.
- Hachem, P., M. Lisbonne, et al. (2005). "Alpha-galactosylceramide-induced iNKT cells suppress experimental allergic asthma in sensitized mice: role of IFN-gamma." *Eur J Immunol* **35**(10): 2793-2802.
- Hammond, K. J., L. D. Poulton, et al. (1998). "alpha/beta-T cell receptor (TCR)+CD4-CD8- (NKT) thymocytes prevent insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic (NOD)/Lt mice by the influence of interleukin (IL)-4 and/or IL-10." *J Exp Med* **187**(7): 1047-1056.
- Harrington, L. E., R. D. Hatton, et al. (2005). "Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages." *Nat Immunol* **6**(11): 1123-1132.
- Havenar-Daughton, C., S. Li, et al. (2012). "Development and function of murine RORgammat+ iNKT cells are under TGF-beta control." *Blood*.
- Hemdan, N. Y., G. Birkenmeier, et al. (2010). "Interleukin-17-producing T helper cells in autoimmunity." *Autoimmun Rev* **9**(11): 785-792.
- Higgins, S. C., A. G. Jarnicki, et al. (2006). "TLR4 mediates vaccine-induced protective cellular immunity to Bordetella pertussis: role of IL-17-producing T cells." *J Immunol* **177**(11): 7980-7989.
- Hsieh, C. S., S. E. Macatonia, et al. (1993). "Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages." *Science* **260**(5107): 547-549.
- Hu, T., I. Gimferrer, et al. (2011). "Control of early stages in invariant natural killer T-cell development." *Immunology* **134**(1): 1-7.
- Hu, T., A. Simmons, et al. (2010). "The transcription factor c-Myb primes CD4+CD8+ immature thymocytes for selection into the iNKT lineage." *Nat Immunol* **11**(5): 435-441.
- Hu, W., T. D. Troutman, et al. (2011). "Priming microenvironments dictate cytokine requirements for T helper 17 cell lineage commitment." *Immunity* **35**(6): 1010-1022.

- Hwang, E. S., S. J. Szabo, et al. (2005). "T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3." *Science* **307**(5708): 430-433.
- Imai, K., M. Kanno, et al. (1986). "Sequence and expression of transcripts of the T-cell antigen receptor alpha-chain gene in a functional, antigen-specific suppressor-T-cell hybridoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(22): 8708-8712.
- Ivanov, II, L. Frutos Rde, et al. (2008). "Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine." *Cell Host Microbe* **4**(4): 337-349.
- Ivanov, II, B. S. McKenzie, et al. (2006). "The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells." *Cell* **126**(6): 1121-1133.
- Iyoda, T., M. Ushida, et al. (2010). "Invariant NKT cell anergy is induced by a strong TCR-mediated signal plus co-stimulation." *Int Immunol* **22**(11): 905-913.
- Ji, Y., S. Sun, et al. (2012). "Activation of Natural Killer T Cells Promotes M2 Macrophage Polarization in Adipose Tissue and Improves Systemic Glucose Tolerance via Interleukin-4 (IL-4)/STAT6 Protein Signaling Axis in Obesity." *J Biol Chem* **287**(17): 13561-13571.
- Jordan, M. A., J. M. Fletcher, et al. (2011). "Role of SLAM in NKT cell development revealed by transgenic complementation in NOD mice." *J Immunol* **186**(7): 3953-3965.
- Jordan, M. A., J. M. Fletcher, et al. (2007). "Slamf1, the NKT cell control gene Nkt1." *J Immunol* **178**(3): 1618-1627.
- Kaplan, M. H., Y. L. Sun, et al. (1996). "Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice." *Nature* **382**(6587): 174-177.
- Kastelein, R. A., C. A. Hunter, et al. (2007). "Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation." *Annu Rev Immunol* **25**: 221-242.
- Kau, A. L., P. P. Ahern, et al. (2011). "Human nutrition, the gut microbiome and the immune system." *Nature* **474**(7351): 327-336.
- Kawaguchi, M., M. Adachi, et al. (2004). "IL-17 cytokine family." *J Allergy Clin Immunol* **114**(6): 1265-1273; quiz 1274.
- Kawano, T., J. Cui, et al. (1997). "CD1d-restricted and TCR-mediated activation of α 14 NKT cells by glycosylceramides." *Science* **278**(5343): 1626-1629.
- Kim, C. H., B. Johnston, et al. (2002). "Trafficking machinery of NKT cells: shared and differential chemokine receptor expression among V α 24(+)V β 11(+) NKT cell subsets with distinct cytokine-producing capacity." *Blood* **100**(1): 11-16.
- Kim, J. S., J. E. Smith-Garvin, et al. (2011). "The requirements for natural Th17 cell development are distinct from those of conventional Th17 cells." *J Exp Med* **208**(11): 2201-2207.
- Kim, P. J., S. Y. Pai, et al. (2006). "GATA-3 regulates the development and function of invariant NKT cells." *J Immunol* **177**(10): 6650-6659.

- Kinjo, Y., E. Tupin, et al. (2006). "Natural killer T cells recognize diacylglycerol antigens from pathogenic bacteria." *Nat Immunol* **7**(9): 978-986.
- Kinjo, Y., D. Wu, et al. (2005). "Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells." *Nature* **434**(7032): 520-525.
- Klein, L., M. Hinterberger, et al. (2009). "Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction." *Nat Rev Immunol* **9**(12): 833-844.
- Kleinschek, M. A., K. Boniface, et al. (2009). "Circulating and gut-resident human Th17 cells express CD161 and promote intestinal inflammation." *J Exp Med* **206**(3): 525-534.
- Klotz, L., S. Burgdorf, et al. (2009). "The nuclear receptor PPAR gamma selectively inhibits Th17 differentiation in a T cell-intrinsic fashion and suppresses CNS autoimmunity." *J Exp Med* **206**(10): 2079-2089.
- Kohrt, H. E., A. B. Pillai, et al. (2010). "NKT cells, Treg, and their interactions in bone marrow transplantation." *Eur J Immunol* **40**(7): 1862-1869.
- Komiyama, Y., S. Nakae, et al. (2006). "IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Immunol* **177**(1): 566-573.
- Korn, T., E. Bettelli, et al. (2007). "IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells." *Nature* **448**(7152): 484-487.
- Korn, T., E. Bettelli, et al. (2009). "IL-17 and Th17 Cells." *Annu Rev Immunol* **27**: 485-517.
- Koseki, H., K. Imai, et al. (1989). "Predominant use of a particular alpha-chain in suppressor T cell hybridomas specific for keyhole limpet hemocyanin." *Int Immunol* **1**(6): 557-564.
- Kovalovsky, D., E. S. Alonzo, et al. (2010). "PLZF induces the spontaneous acquisition of memory/effector functions in T cells independently of NKT cell-related signals." *J Immunol* **184**(12): 6746-6755.
- Kovalovsky, D., O. U. Uche, et al. (2008). "The BTB-zinc finger transcriptional regulator PLZF controls the development of invariant natural killer T cell effector functions." *Nat Immunol* **9**(9): 1055-1064.
- Kreslavsky, T., A. K. Savage, et al. (2009). "TCR-inducible PLZF transcription factor required for innate phenotype of a subset of gammadelta T cells with restricted TCR diversity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(30): 12453-12458.
- Kroenke, M. A., T. J. Carlson, et al. (2008). "IL-12- and IL-23-modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition." *J Exp Med* **205**(7): 1535-1541.
- Langrish, C. L., Y. Chen, et al. (2005). "IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation." *J Exp Med* **201**(2): 233-240.
- Lantz, O. and A. Bendelac (1994). "An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans." *J Exp Med* **180**(3): 1097-1106.

- Latour, S., G. Gish, et al. (2001). "Regulation of SLAM-mediated signal transduction by SAP, the X-linked lymphoproliferative gene product." *Nat Immunol* **2**(8): 681-690.
- Latour, S., R. Roncagalli, et al. (2003). "Binding of SAP SH2 domain to FynT SH3 domain reveals a novel mechanism of receptor signalling in immune regulation." *Nat Cell Biol* **5**(2): 149-154.
- Laurence, A., C. M. Tato, et al. (2007). "Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation." *Immunity* **26**(3): 371-381.
- Lazarevic, V., A. J. Zullo, et al. (2009). "The gene encoding early growth response 2, a target of the transcription factor NFAT, is required for the development and maturation of natural killer T cells." *Nat Immunol* **10**(3): 306-313.
- Lee, P. T., K. Benlagha, et al. (2002). "Distinct functional lineages of human V(alpha)24 natural killer T cells." *J Exp Med* **195**(5): 637-641.
- Lehuen, A., O. Lantz, et al. (1998). "Overexpression of natural killer T cells protects Valpha14-Jalpha281 transgenic nonobese diabetic mice against diabetes." *J Exp Med* **188**(10): 1831-1839.
- Leite-De-Moraes, M. C., A. Hameg, et al. (1999). "A distinct IL-18-induced pathway to fully activate NK T lymphocytes independently from TCR engagement." *J Immunol* **163**(11): 5871-5876.
- Leite-de-Moraes, M. C., A. Herbelin, et al. (2000). "Fas/Fas ligand interactions promote activation-induced cell death of NK T lymphocytes." *J Immunol* **165**(8): 4367-4371.
- Leonardi, C., R. Matheson, et al. (2012). "Anti-interleukin-17 monoclonal antibody ixekizumab in chronic plaque psoriasis." *N Engl J Med* **366**(13): 1190-1199.
- Li, D. and X. N. Xu (2008). "NKT cells in HIV-1 infection." *Cell Res* **18**(8): 817-822.
- Liang, S. C., X. Y. Tan, et al. (2006). "Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides." *J Exp Med* **203**(10): 2271-2279.
- Lighvani, A. A., D. M. Frucht, et al. (2001). "T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(26): 15137-15142.
- Lisbonne, M., S. Diem, et al. (2003). "Cutting edge: invariant V alpha 14 NKT cells are required for allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity in an experimental asthma model." *J Immunol* **171**(4): 1637-1641.
- Liu, Y., R. D. Goff, et al. (2006). "A modified alpha-galactosyl ceramide for staining and stimulating natural killer T cells." *J Immunol Methods* **312**(1-2): 34-39.
- Lochner, M., M. Berard, et al. (2011). "Restricted microbiota and absence of cognate TCR antigen leads to an unbalanced generation of Th17 cells." *J Immunol* **186**(3): 1531-1537.
- Lochner, M., L. Peduto, et al. (2008). "In vivo equilibrium of proinflammatory IL-17+ and regulatory IL-10+ Foxp3+ RORgamma t+ T cells." *J Exp Med* **205**(6): 1381-1393.
- Locksley, R. M. (2009). "Nine lives: plasticity among T helper cell subsets." *J Exp Med* **206**(8): 1643-1646.

- Mallewaey, T., J. P. Zanetta, et al. (2006). "Activation of invariant NKT cells by the helminth parasite *schistosoma mansoni*." *J Immunol* **176**(4): 2476-2485.
- Manetti, R., P. Parronchi, et al. (1993). "Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells." *J Exp Med* **177**(4): 1199-1204.
- Mangan, P. R., L. E. Harrington, et al. (2006). "Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage." *Nature* **441**(7090): 231-234.
- Marks, B. R., H. N. Nowyhed, et al. (2009). "Thymic self-reactivity selects natural interleukin 17-producing T cells that can regulate peripheral inflammation." *Nat Immunol* **10**(10): 1125-1132.
- Martin, B., K. Hirota, et al. (2009). "Interleukin-17-producing gammadelta T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals." *Immunity* **31**(2): 321-330.
- Matsuda, J. L., L. Gapin, et al. (2002). "Homeostasis of V alpha 14i NKT cells." *Nat Immunol* **3**(10): 966-974.
- Matsuda, J. L., O. V. Naidenko, et al. (2000). "Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers." *J Exp Med* **192**(5): 741-754.
- McGeachy, M. J. and D. J. Cua (2008). "Th17 cell differentiation: the long and winding road." *Immunity* **28**(4): 445-453.
- McNab, F. W., S. P. Berzins, et al. (2005). "The influence of CD1d in postselection NKT cell maturation and homeostasis." *J Immunol* **175**(6): 3762-3768.
- McNab, F. W., D. G. Pellicci, et al. (2007). "Peripheral NK1.1 NKT cells are mature and functionally distinct from their thymic counterparts." *J Immunol* **179**(10): 6630-6637.
- Michel, M. L., A. C. Keller, et al. (2007). "Identification of an IL-17-producing NK1.1(neg) iNKT cell population involved in airway neutrophilia." *J Exp Med* **204**(5): 995-1001.
- Michel, M. L., D. Mendes-da-Cruz, et al. (2008). "Critical role of ROR-gammat in a new thymic pathway leading to IL-17-producing invariant NKT cell differentiation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(50): 19845-19850.
- Mills, K. H. (2011). "TLR-dependent T cell activation in autoimmunity." *Nat Rev Immunol* **11**(12): 807-822.
- Milpied, P., B. Massot, et al. (2011). "IL-17-producing invariant NKT cells in lymphoid organs are recent thymic emigrants identified by neuropilin-1 expression." *Blood* **118**(11): 2993-3002.
- Miyamoto, K., S. Miyake, et al. (2001). "A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells." *Nature* **413**(6855): 531-534.
- Moreira-Teixeira, L., M. Resende, et al. (2011). "Proinflammatory environment dictates the IL-17-producing capacity of human invariant NKT cells." *J Immunol* **186**(10): 5758-5765.

- Mosmann, T. R., H. Cherwinski, et al. (1986). "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins." *J Immunol* **136**(7): 2348-2357.
- Motsinger, A., D. W. Haas, et al. (2002). "CD1d-restricted human natural killer T cells are highly susceptible to human immunodeficiency virus 1 infection." *J Exp Med* **195**(7): 869-879.
- Mucida, D. and H. Cheroutre (2010). "The many face-lifts of CD4 T helper cells." *Adv Immunol* **107**: 139-152.
- Mullen, A. C., F. A. High, et al. (2001). "Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection." *Science* **292**(5523): 1907-1910.
- Murphy, C. A., C. L. Langrish, et al. (2003). "Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation." *J Exp Med* **198**(12): 1951-1957.
- Nagarajan, N. A. and M. Kronenberg (2007). "Invariant NKT cells amplify the innate immune response to lipopolysaccharide." *J Immunol* **178**(5): 2706-2713.
- Naidenko, O. V., J. K. Maher, et al. (1999). "Binding and antigen presentation of ceramide-containing glycolipids by soluble mouse and human CD1d molecules." *J Exp Med* **190**(8): 1069-1080.
- Neufert, C., C. Becker, et al. (2007). "IL-27 controls the development of inducible regulatory T cells and Th17 cells via differential effects on STAT1." *Eur J Immunol* **37**(7): 1809-1816.
- Nichols, K. E., J. Hom, et al. (2005). "Regulation of NKT cell development by SAP, the protein defective in XLP." *Nat Med* **11**(3): 340-345.
- Nikolich-Zugich, J., M. K. Slifka, et al. (2004). "The many important facets of T-cell repertoire diversity." *Nat Rev Immunol* **4**(2): 123-132.
- Nunez-Cruz, S., W. C. Yeo, et al. (2008). "Differential requirement for the SAP-Fyn interaction during NK T cell development and function." *J Immunol* **181**(4): 2311-2320.
- Nurieva, R., X. O. Yang, et al. (2007). "Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells." *Nature* **448**(7152): 480-483.
- Oh, S. J., J. H. Kim, et al. (2008). "Role of type II NKT cells in the suppression of graft-versus-host disease." *Crit Rev Immunol* **28**(3): 249-267.
- Ohteki, T., S. Ho, et al. (1997). "Role for IL-15/IL-15 receptor beta-chain in natural killer 1.1+ T cell receptor-alpha beta+ cell development." *J Immunol* **159**(12): 5931-5935.
- Oppmann, B., R. Lesley, et al. (2000). "Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12." *Immunity* **13**(5): 715-725.
- Ouyang, W. (2010). "Distinct roles of IL-22 in human psoriasis and inflammatory bowel disease." *Cytokine Growth Factor Rev* **21**(6): 435-441.
- Paget, C., S. Ivanov, et al. (2012). "Interleukin-22 is produced by invariant natural killer T lymphocytes during influenza A virus infection: potential role in protection against lung epithelial damages." *J Biol Chem* **287**(12): 8816-8829.

- Papp, K. A., C. Leonardi, et al. (2012). "Brodalumab, an anti-interleukin-17-receptor antibody for psoriasis." *N Engl J Med* **366**(13): 1181-1189.
- Park, H., Z. Li, et al. (2005). "A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17." *Nat Immunol* **6**(11): 1133-1141.
- Pasquier, B., L. Yin, et al. (2005). "Defective NKT cell development in mice and humans lacking the adapter SAP, the X-linked lymphoproliferative syndrome gene product." *J Exp Med* **201**(5): 695-701.
- Paul, W. E. and J. Zhu (2010). "How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified?" *Nat Rev Immunol* **10**(4): 225-235.
- Pellicci, D. G., K. J. Hammond, et al. (2002). "A natural killer T (NKT) cell developmental pathway involving a thymus-dependent NK1.1(-)CD4(+) CD1d-dependent precursor stage." *J Exp Med* **195**(7): 835-844.
- Pellicci, D. G., A. P. Uldrich, et al. (2003). "Intrathymic NKT cell development is blocked by the presence of alpha-galactosylceramide." *Eur J Immunol* **33**(7): 1816-1823.
- Pene, J., S. Chevalier, et al. (2008). "Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated Th17 lymphocytes." *J Immunol* **180**(11): 7423-7430.
- Pham-Thi, N., J. de Blic, et al. (2006). "Enhanced frequency of immunoregulatory invariant natural killer T cells in the airways of children with asthma." *J Allergy Clin Immunol* **117**(1): 217-218.
- Pham-Thi, N., J. de Blic, et al. (2006). "Invariant natural killer T cells in bronchial asthma." *N Engl J Med* **354**(24): 2613-2616; author reply 2613-2616.
- Pickert, G., C. Neufert, et al. (2009). "STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing." *J Exp Med* **206**(7): 1465-1472.
- Porubsky, S., A. O. Speak, et al. (2007). "Normal development and function of invariant natural killer T cells in mice with isoglobotrihexosylceramide (iGb3) deficiency." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(14): 5977-5982.
- Powolny-Budnicka, I., M. Riemann, et al. (2011). "RelA and RelB transcription factors in distinct thymocyte populations control lymphotoxin-dependent interleukin-17 production in gammadelta T cells." *Immunity* **34**(3): 364-374.
- Qi, Q., W. Huang, et al. (2012). "A unique role for ITK in survival of invariant NKT cells associated with the p53-dependent pathway in mice." *J Immunol* **188**(8): 3611-3619.
- Rachitskaya, A. V., A. M. Hansen, et al. (2008). "Cutting edge: NKT cells constitutively express IL-23 receptor and RORgamma and rapidly produce IL-17 upon receptor ligation in an IL-6-independent fashion." *J Immunol* **180**(8): 5167-5171.
- Reboldi, A., C. Coisne, et al. (2009). "C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE." *Nat Immunol* **10**(5): 514-523.

- Ribot, J. C., A. deBarros, et al. (2009). "CD27 is a thymic determinant of the balance between interferon-gamma- and interleukin 17-producing gammadelta T cell subsets." Nat Immunol **10**(4): 427-436.
- Rubino, S. J., K. Geddes, et al. (2012). "Innate IL-17 and IL-22 responses to enteric bacterial pathogens." Trends Immunol **33**(3): 112-118.
- Rubio, M. T., L. Moreira-Teixeira, et al. (2012). "Early post-transplant donor-derived invariant natural killer T cell recovery predicts the occurrence of acute graft-versus-host disease and overall survival." Blood.
- Rutz, S., R. Noubade, et al. (2011). "Transcription factor c-Maf mediates the TGF-beta-dependent suppression of IL-22 production in T(H)17 cells." Nat Immunol **12**(12): 1238-1245.
- Rutz, S. and W. Ouyang (2011). "Regulation of interleukin-10 and interleukin-22 expression in T helper cells." Curr Opin Immunol **23**(5): 605-612.
- Sandberg, J. K., N. M. Fast, et al. (2002). "Selective loss of innate CD4(+) V alpha 24 natural killer T cells in human immunodeficiency virus infection." J Virol **76**(15): 7528-7534.
- Sato, H., T. Nakayama, et al. (1999). "Induction of differentiation of pre-NKT cells to mature Valpha14 NKT cells by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(13): 7439-7444.
- Satoh-Takayama, N., C. A. Vosshenrich, et al. (2008). "Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal NKp46+ cells that provide innate mucosal immune defense." Immunity **29**(6): 958-970.
- Savage, A. K., M. G. Constantinides, et al. (2011). "Promyelocytic leukemia zinc finger turns on the effector T cell program without requirement for agonist TCR signaling." J Immunol **186**(10): 5801-5806.
- Savage, A. K., M. G. Constantinides, et al. (2008). "The transcription factor PLZF directs the effector program of the NKT cell lineage." Immunity **29**(3): 391-403.
- Sawa, S., M. Cherrier, et al. (2010). "Lineage relationship analysis of RORgammat+ innate lymphoid cells." Science **330**(6004): 665-669.
- Schmechel, S., A. Konrad, et al. (2008). "Linking genetic susceptibility to Crohn's disease with Th17 cell function: IL-22 serum levels are increased in Crohn's disease and correlate with disease activity and IL23R genotype status." Inflamm Bowel Dis **14**(2): 204-212.
- Schmidt-Supprian, M., J. Tian, et al. (2004). "Differential dependence of CD4+CD25+ regulatory and natural killer-like T cells on signals leading to NF-kappaB activation." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(13): 4566-4571.
- Schmieg, J., G. Yang, et al. (2003). "Superior protection against malaria and melanoma metastases by a C-glycoside analogue of the natural killer T cell ligand alpha-Galactosylceramide." J Exp Med **198**(11): 1631-1641.
- Schnyder-Candrian, S., D. Togbe, et al. (2006). "Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma." J Exp Med **203**(12): 2715-2725.

- Schwartz, S., J. F. Beaulieu, et al. (2005). "Interleukin-17 is a potent immuno-modulator and regulator of normal human intestinal epithelial cell growth." *Biochem Biophys Res Commun* **337**(2): 505-509.
- Seiler, M. P., R. Mathew, et al. (2012). "Elevated and sustained expression of the transcription factors Egr1 and Egr2 controls NKT lineage differentiation in response to TCR signaling." *Nat Immunol* **13**(3): 264-271.
- Sharif, S., G. A. Arreaza, et al. (2001). "Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune Type 1 diabetes." *Nat Med* **7**(9): 1057-1062.
- Shaw, M. H., N. Kamada, et al. (2012). "Microbiota-induced IL-1beta, but not IL-6, is critical for the development of steady-state TH17 cells in the intestine." *J Exp Med* **209**(2): 251-258.
- Shimoda, K., J. van Deursen, et al. (1996). "Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene." *Nature* **380**(6575): 630-633.
- Simarro, M., A. Lanyi, et al. (2004). "SAP increases FynT kinase activity and is required for phosphorylation of SLAM and Ly9." *Int Immunol* **16**(5): 727-736.
- Sivakumar, V., K. J. Hammond, et al. (2003). "Differential requirement for Rel/nuclear factor kappa B family members in natural killer T cell development." *J Exp Med* **197**(12): 1613-1621.
- Smyth, M. J., K. Y. Thia, et al. (2000). "Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells." *J Exp Med* **191**(4): 661-668.
- Sonnenberg, G. F., L. A. Fouser, et al. (2011). "Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22." *Nat Immunol* **12**(5): 383-390.
- Sonnenberg, G. F., L. A. Monticelli, et al. (2011). "CD4(+) lymphoid tissue-inducer cells promote innate immunity in the gut." *Immunity* **34**(1): 122-134.
- Souwer, Y., K. Szegedi, et al. (2010). "IL-17 and IL-22 in atopic allergic disease." *Curr Opin Immunol* **22**(6): 821-826.
- Spits, H. and J. P. Di Santo (2011). "The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling." *Nat Immunol* **12**(1): 21-27.
- Stanic, A. K., J. S. Bezbradica, et al. (2004). "NF-kappa B controls cell fate specification, survival, and molecular differentiation of immunoregulatory natural T lymphocytes." *J Immunol* **172**(4): 2265-2273.
- Stankovic, S., R. Gugasyan, et al. (2011). "Distinct roles in NKT cell maturation and function for the different transcription factors in the classical NF-kappaB pathway." *Immunol Cell Biol* **89**(2): 294-303.
- Stumhofer, J. S., A. Laurence, et al. (2006). "Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system." *Nat Immunol* **7**(9): 937-945.

- Sugimoto, K., A. Ogawa, et al. (2008). "IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis." *J Clin Invest* **118**(2): 534-544.
- Sullivan, B. A., N. A. Nagarajan, et al. (2010). "Mechanisms for glycolipid antigen-driven cytokine polarization by Valpha14i NKT cells." *J Immunol* **184**(1): 141-153.
- Sutton, C. E., S. J. Lalor, et al. (2009). "Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity." *Immunity* **31**(2): 331-341.
- Szabo, S. J., S. T. Kim, et al. (2000). "A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment." *Cell* **100**(6): 655-669.
- Szabo, S. J., B. M. Sullivan, et al. (2003). "Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses." *Annu Rev Immunol* **21**: 713-758.
- Takai, T. (2012). "TSLP expression: cellular sources, triggers, and regulatory mechanisms." *Allergol Int* **61**(1): 3-17.
- Takatori, H., Y. Kanno, et al. (2009). "Lymphoid tissue inducer-like cells are an innate source of IL-17 and IL-22." *J Exp Med* **206**(1): 35-41.
- Takeda, K., T. Tanaka, et al. (1996). "Essential role of Stat6 in IL-4 signalling." *Nature* **380**(6575): 627-630.
- Tanaka, S., T. Yoshimoto, et al. (2009). "Natural occurring IL-17 producing T cells regulate the initial phase of neutrophil mediated airway responses." *J Immunol* **183**(11): 7523-7530.
- Taniguchi, M., M. Harada, et al. (2003). "The regulatory role of Valpha14 NKT cells in innate and acquired immune response." *Annu Rev Immunol* **21**: 483-513.
- Taniguchi, M. and T. Nakayama (2000). "Recognition and function of Valpha14 NKT cells." *Semin Immunol* **12**(6): 543-550.
- Terabe, M. and J. A. Berzofsky (2008). "The role of NKT cells in tumor immunity." *Adv Cancer Res* **101**: 277-348.
- Thierfelder, W. E., J. M. van Deursen, et al. (1996). "Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells." *Nature* **382**(6587): 171-174.
- Thomas, S. Y., C. M. Lilly, et al. (2006). "Invariant natural killer T cells in bronchial asthma." *N Engl J Med* **354**(24): 2613-2616; author reply 2613-2616.
- Townsend, M. J., A. S. Weinmann, et al. (2004). "T-bet regulates the terminal maturation and homeostasis of NK and Valpha14i NKT cells." *Immunity* **20**(4): 477-494.
- Trifari, S., C. D. Kaplan, et al. (2009). "Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells." *Nat Immunol* **10**(8): 864-871.
- Trinchieri, G., S. Pflanz, et al. (2003). "The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses." *Immunity* **19**(5): 641-644.

- Tupin, E., Y. Kinjo, et al. (2007). "The unique role of natural killer T cells in the response to microorganisms." *Nat Rev Microbiol* **5**(6): 405-417.
- Ueda, A., L. Zhou, et al. (2012). "Fyn promotes Th17 differentiation by regulating the kinetics of RORgammat and Foxp3 expression." *J Immunol* **188**(11): 5247-5256.
- Uldrich, A. P., N. Y. Crowe, et al. (2005). "NKT cell stimulation with glycolipid antigen in vivo: costimulation-dependent expansion, Bim-dependent contraction, and hyporesponsiveness to further antigenic challenge." *J Immunol* **175**(5): 3092-3101.
- Uldrich, A. P., O. Patel, et al. (2011). "A semi-invariant Valpha10+ T cell antigen receptor defines a population of natural killer T cells with distinct glycolipid antigen-recognition properties." *Nat Immunol* **12**(7): 616-623.
- Unutmaz, D. (2003). "NKT cells and HIV infection." *Microbes Infect* **5**(11): 1041-1047.
- Usui, T., R. Nishikomori, et al. (2003). "GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12Rbeta2 chain or T-bet." *Immunity* **18**(3): 415-428.
- van der Vliet, H. J., B. M. von Blomberg, et al. (2002). "Selective decrease in circulating V alpha 24+V beta 11+ NKT cells during HIV type 1 infection." *J Immunol* **168**(3): 1490-1495.
- van Hamburg, J. P., P. S. Asmawidjaja, et al. (2011). "Th17 cells, but not Th1 cells, from patients with early rheumatoid arthritis are potent inducers of matrix metalloproteinases and proinflammatory cytokines upon synovial fibroblast interaction, including autocrine interleukin-17A production." *Arthritis Rheum* **63**(1): 73-83.
- Van Kaer, L. (2005). "alpha-Galactosylceramide therapy for autoimmune diseases: prospects and obstacles." *Nat Rev Immunol* **5**(1): 31-42.
- Veillette, A., Z. Dong, et al. (2007). "Consequence of the SLAM-SAP signaling pathway in innate-like and conventional lymphocytes." *Immunity* **27**(5): 698-710.
- Veldhoen, M., R. J. Hocking, et al. (2006). "TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells." *Immunity* **24**(2): 179-189.
- Waisman, A. (2012). "To be 17 again--anti-interleukin-17 treatment for psoriasis." *N Engl J Med* **366**(13): 1251-1252.
- Wang, B., Y. B. Geng, et al. (2001). "CD1-restricted NK T cells protect nonobese diabetic mice from developing diabetes." *J Exp Med* **194**(3): 313-320.
- Wang, L., T. Carr, et al. (2010). "The sequential activity of Gata3 and Thpok is required for the differentiation of CD1d-restricted CD4+ NKT cells." *Eur J Immunol* **40**(9): 2385-2390.
- Weaver, C. T., R. D. Hatton, et al. (2007). "IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages." *Annu Rev Immunol* **25**: 821-852.
- Wilson, M. T., C. Johansson, et al. (2003). "The response of natural killer T cells to glycolipid antigens is characterized by surface receptor down-modulation and expansion." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(19): 10913-10918.

- Wolk, K., S. Kunz, et al. (2002). "Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members?" *J Immunol* **168**(11): 5397-5402.
- Wolk, K., S. Kunz, et al. (2004). "IL-22 increases the innate immunity of tissues." *Immunity* **21**(2): 241-254.
- Wolk, K., E. Witte, et al. (2006). "IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis." *Eur J Immunol* **36**(5): 1309-1323.
- Wolk, K., E. Witte, et al. (2010). "Biology of interleukin-22." *Semin Immunopathol* **32**(1): 17-31.
- Wu, C., K. B. Nguyen, et al. (2001). "SAP controls T cell responses to virus and terminal differentiation of TH2 cells." *Nat Immunol* **2**(5): 410-414.
- Wu, L. and L. Van Kaer (2009). "Natural killer T cells and autoimmune disease." *Curr Mol Med* **9**(1): 4-14.
- Wu, T. N., K. H. Lin, et al. (2011). "Avidity of CD1d-ligand-receptor ternary complex contributes to T-helper 1 (Th1) polarization and anticancer efficacy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(42): 17275-17280.
- Yang, X. O., B. P. Pappu, et al. (2008). "T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma." *Immunity* **28**(1): 29-39.
- Yao, Z., M. K. Spriggs, et al. (1997). "Molecular characterization of the human interleukin (IL)-17 receptor." *Cytokine* **9**(11): 794-800.
- Yin, L., U. Al-Alem, et al. (2003). "Mice deficient in the X-linked lymphoproliferative disease gene sap exhibit increased susceptibility to murine gammaherpesvirus-68 and hypo-gammaglobulinemia." *J Med Virol* **71**(3): 446-455.
- Zenewicz, L. A., G. D. Yancopoulos, et al. (2008). "Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease." *Immunity* **29**(6): 947-957.
- Zhan, Y., D. Bourges, et al. (2007). "The origin of thymic CD4+CD25+ regulatory T cells and their co-stimulatory requirements are determined after elimination of recirculating peripheral CD4+ cells." *Int Immunol* **19**(4): 455-463.
- Zhao, Y., J. Yang, et al. (2010). "Th17 immunity in patients with allergic asthma." *Int Arch Allergy Immunol* **151**(4): 297-307.
- Zheng, Y., D. M. Danilenko, et al. (2007). "Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis." *Nature* **445**(7128): 648-651.
- Zheng, Y., P. A. Valdez, et al. (2008). "Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens." *Nat Med* **14**(3): 282-289.
- Zhou, D., J. Mattner, et al. (2004). "Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells." *Science* **306**(5702): 1786-1789.

- Zhou, L., Ivanov, II, et al. (2007). "IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways." *Nat Immunol* **8**(9): 967-974.
- Zhu, J., H. Yamane, et al. (2010, Mar). "Differentiation of effector CD4 T cell populations (*)." *Annu Rev Immunol* 2010/03/03. 28, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20192806>.
- Zhu, S. and Y. Qian (2012). "IL-17/IL-17 receptor system in autoimmune disease: mechanisms and therapeutic potential." *Clin Sci (Lond)* **122**(11): 487-511.

IL-17-producing invariant NKT cells in lymphoid organs are recent thymic emigrants identified by neuropilin-1 expression

Pierre Milpied,¹ Bérangère Massot,¹ Amédée Renand,¹ Séverine Diem,¹ André Herbelin,² Maria Leite-da-Moraes,¹ Marie-Thérèse Rubio,¹ and Olivier Hermine¹

¹Centre National de la Recherche Scientifique, Université Paris Descartes, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker Enfants Malades, Paris, France; and ²Inserm Université Paris Sud XI, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France

Despite increasing knowledge on the mechanisms of invariant natural killer T (iNKT)-cell development in the thymus, the function of recent thymic emigrant (RTE) iNKT cells remains largely unexplored, principally because of a lack of bona fide markers to distinguish RTE from long-lived iNKT cells. Whether the recently described IL-17-producing iNKT cell subset is part of RTE has not been addressed. In the present study, we

show that neuropilin-1 (Nrp-1), a transmembrane receptor mainly found on T-regulatory (Treg) cells in the murine immune system, is specifically expressed on RTE iNKT cells in naive mice. We used the Nrp-1 marker to discriminate RTE from mature iNKT cells and compare their functions. We show that RTE iNKT cells proliferate more than mature iNKT cells after *in vitro* activation; that, unlike mature iNKT cells, most RTE iNKT cells fail

to rapidly produce IFN- γ and IL-4 after *in vivo* activation; and, most importantly, that IL-17-producing iNKT cells in lymphoid organs of naive mice are contained within the RTE iNKT cell pool. Our results establish an accurate marker of RTE iNKT cells and reveal that continuous thymic output is required for pro-inflammatory IL-17 secretion, a key function of adult iNKT cells. (*Blood*. 2011;118(11):3003-3002)

Introduction

Invariant natural killer T (iNKT) cells are innate-like T lymphocytes expressing a semi-invariant TCR that recognizes endogenous and exogenous glycolipid antigens presented by the MHC class I-like molecule CD1d.^{1,2} Most iNKT cells are characterized by an activated memory phenotype (CD44^{hi}, CD69⁺), the expression of NK cell markers (CD122, NK1.1), and the rapid secretion of both IFN- γ and IL-4 after stimulation with antigens such as α -galactosylceramide (α -GalCer).³ Invariant NKT cells develop in the thymus, where double-positive (DP) thymocytes expressing the canonical Val14J α 18 TCR rearrangement are positively selected by CD1d-expressing DP cells.⁴⁻⁶ Selected iNKT cells undergo several steps of maturation characterized by distinct phenotypes and functions: stage I (NK1.1⁻ CD44^{low}) and stage II (NK1.1⁻ CD44^{hi}) iNKT cells proliferate intensely and secrete mostly IL-4, whereas stage III (NK1.1⁺ CD44^{hi}) iNKT cells are resting, secrete both IL-4 and IFN- γ , and are long-term thymus residents.⁷⁻¹⁰ Thymic export of iNKT cells to the periphery occurs at stage II and most of the exported cells quickly mature into NK1.1⁺ iNKT cells.^{7,8} However, some iNKT cells remain NK1.1⁻ late after thymic export.¹¹

Recently, NK1.1⁻ iNKT cells have been shown to be a potent source of the pro-inflammatory cytokine IL-17.¹²⁻¹⁶ IL-17-producing iNKT cells are therefore part of a broad family of innate IL-17 producers that constitute an efficient first line of defense in the response to cellular stress, tissue injury, and pathogens.¹⁷ Some aspects of IL-17-producing iNKT-cell development have been unraveled,¹⁸ but whether these cells are part of the recent thymic

emigrant (RTE) or of the long-lived NK1.1⁺ iNKT cell subsets has remained controversial. The controversy partially stems from the current unavailability of surface markers with which to accurately discriminate RTE from mature iNKT cells and analyze their functions separately.

Neuropilin-1 (Nrp-1) is a transmembrane receptor for class 3 semaphorins^{19,20} and vascular endothelium growth factor isoforms.²¹ It is expressed in a wide range of tissues and mediates diverse cellular functions such as migration, adhesion, proliferation, and apoptosis.^{22,23} In the murine immune system, Nrp-1 is a marker of Foxp3⁺ T-regulatory (Treg) cells²⁴ and is involved in their suppressive activity through homotypic interactions with Nrp-1 at the surface of dendritic cells²⁵ and activation of latent TGF- β 1.²⁶ Nrp-1 is also expressed on immature thymocytes, but its function in these cells is less well characterized.^{27,28} The expression of Nrp-1 in other murine T-cell subsets has not been investigated to date.

In the present study, we identified a population of Nrp-1⁺ iNKT cells present in the thymus and peripheral lymphoid organs of naive mice. By *in situ* labeling of thymocytes and adult thymectomy, we showed that Nrp-1⁺ iNKT cells correspond to RTE iNKT cells. Using the Nrp-1 marker, we compared the functions of RTE and mature iNKT cells *in vivo* and *in vitro*. Most importantly, RTE iNKT cells in lymphoid organs comprised the pro-inflammatory IL-17-producing subset. We conclude from these experiments that continuous export of RTE iNKT cells makes a substantial contribution to innate IL-17 producers in lymphoid organs of adult mice.

Submitted January 8, 2011; accepted May 24, 2011. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, June 8, 2011; DOI 10.1182/blood-2011-01-323268.

An Inside Blood analysis of this article appears at the front of this issue.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were delayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2011 by The American Society of Hematology

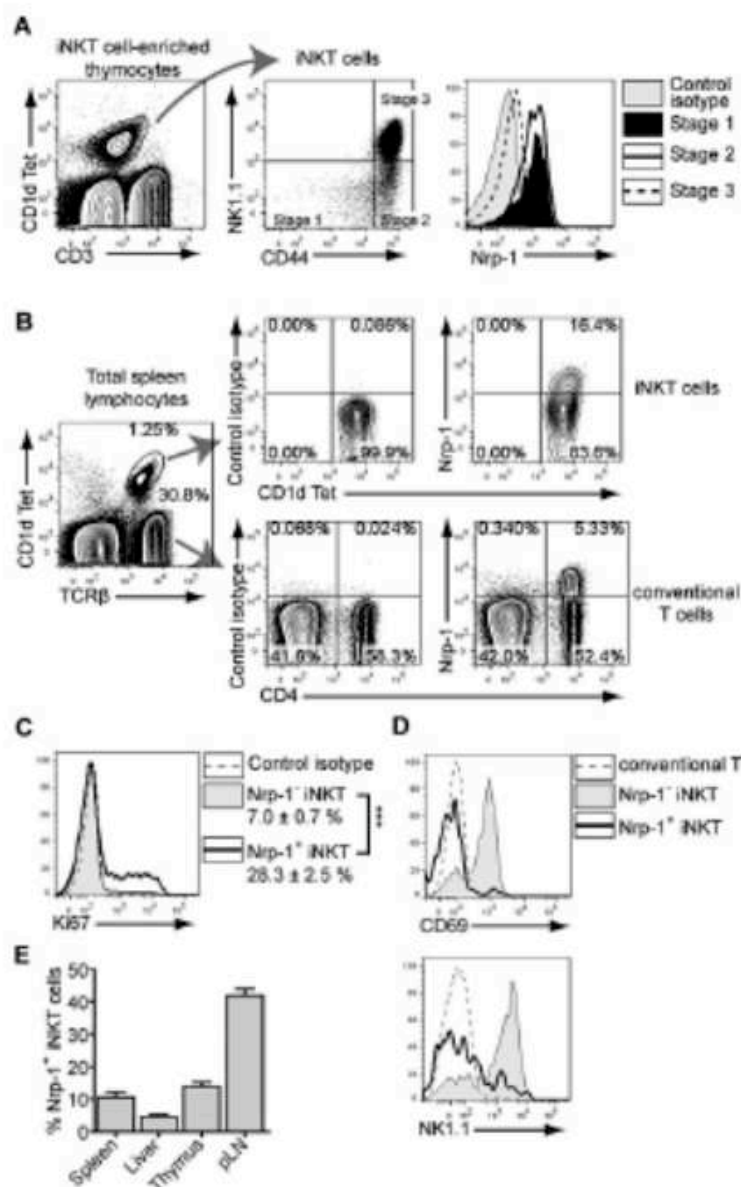


Figure 1. Nrp-1 is expressed in immature thymic and peripheral INKT cells in naive mice. **(A)** Nrp-1 expression in thymic INKT cells. Thymocytes from 7-week-old mice were enriched in INKT cells by depletion of CD8⁺ cells, and the resulting cell suspensions were stained for FACS analysis of Nrp-1 expression in thymic INKT-cell stages. INKT cells were defined as CD3⁺ CD1d Tet⁺ (left dot plot) and stage I (CD44⁺ NK1.1⁺), stage II (CD44⁺ NK1.1⁺), and stage III (CD44⁺ NK1.1⁺) INKT cells were gated as shown on the middle dot plot. The right histogram plot is representative of Nrp-1 expression in stage I (thick black histogram), stage II (thin black line), and stage III (dotted line) INKT cells overlaid on control isotype staining of total INKT cells (shaded gray histogram). **(B)** Representative FACS analysis of Nrp-1 expression in splenic TCRβ⁺ CD1d Tet⁺ INKT cells and TCRβ⁺ CD1d Tet⁺ conventional T cells of 8-week-old naive mice. Note the subset of INKT cells expressing Nrp-1 at the same levels as Treg cells (CD4⁺ Nrp-1⁺ conventional T cells). **(C)** Intracellular staining for the proliferation-associated marker Ki67 in splenic Nrp-1⁺ (shaded gray) and Nrp-1⁺ (thick black line) INKT cells overlaid on control isotype staining (dotted line) of total INKT cells. The percentage of Ki67⁺ cells in both subsets is indicated (n = 5, ***P < .001 by paired Student's t test). **(D)** Representative histogram overlays showing CD69 and NK1.1 expression in splenic conventional T cells (dotted line), Nrp-1⁺ (shaded gray), and Nrp-1⁺ (thick black line) INKT cells. **(E)** Relative proportions of Nrp-1⁺ INKT cells in spleen, liver, thymus, and pLN INKT cells of 8-week-old naive mice (n = 4).

Methods

Mice

C57BL/6 mice were purchased from Janvier. Mice were kept in specific pathogen-free conditions at our animal facility, and experimental studies were performed in accordance with the French Institutional Committee.

Cell preparation

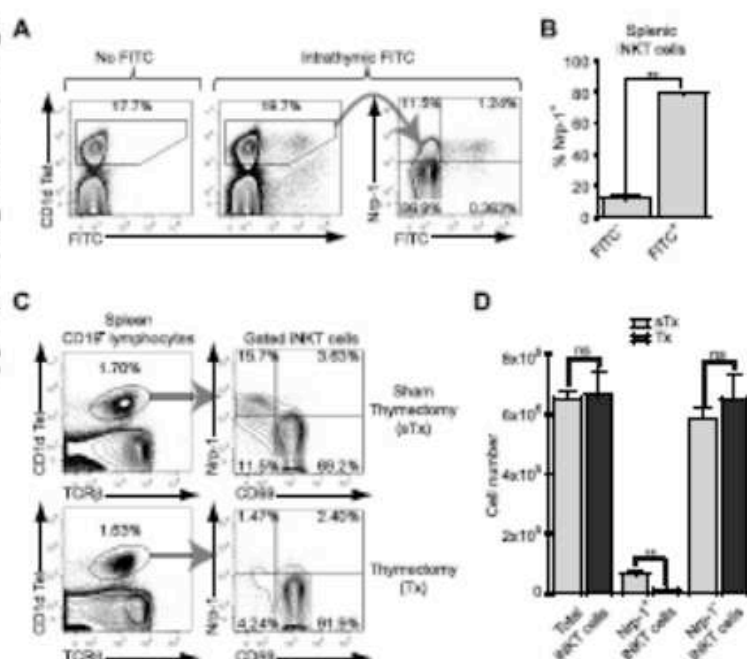
Single-cell suspensions of spleen, thymus, and peripheral lymph nodes (pLNs; pooled inguinal, brachial, and axillary lymph nodes) were obtained by mechanical disruption and passing through a 40-μm cell strainer. Liver mononuclear cells were obtained by mechanical disruption, followed by

centrifugation in a 35% Percoll (Sigma-Aldrich) solution. Red blood cells were removed from spleen and liver cell suspensions by hypotonic shock with ammonium chloride buffer. Viable cells were counted on a hemacytometer using Trypan blue exclusion, and the absolute numbers of lymphocyte subsets were calculated after FACS analysis.

Flow cytometry

Cell surface staining was performed in PBS buffer containing 2% (vol/vol) FCS and 0.01% (wt/vol) NaN₃ on ice (FACS buffer). For intracellular cytokine staining, surface-labeled cells were fixed for 5 minutes in 4% (wt/vol) paraformaldehyde (in PBS) at room temperature, and stained for 30 minutes at room temperature in FACS buffer supplemented with 0.5% (wt/vol) saponin (Sigma-Aldrich). Nuclear Ki67 staining was done using the fixation and permeabilization reagents from a Foxp3 staining kit

Figure 2. Nrp-1 is a marker of RTE INKT cells. (A–B) Five-week-old mice were intrathymically injected with FITC and their spleens recovered after 95 hours. Splenocytes were enriched in INKT cells and Nrp-1 expression was analyzed in INKT cells by FACS. (A) Representative analysis of Nrp-1 and FITC expression in splenic CD1d Tet⁺ INKT cells of control (No FITC) and treated (intrathymic FITC) animals. (B) Nrp-1 expression by FITC⁺ and FITC⁺ splenic INKT cells from treated animals ($n = 4$, pooled data from 2 distinct experiments, ** $P < .01$ by Student's *t* test). (C–D) Eight-week-old mice were thymectomized (Tx) or sham-thymectomized (sTx) and killed 4 weeks later for analysis. (C) Representative FACS analysis of Nrp-1 and CD99 expression in splenic CD1d Tet⁺ CD19⁺ INKT cells of sTx and Tx mice. (D) Absolute numbers of total, Nrp-1⁺, and Nrp-1⁺ INKT cells in the spleens of sTx (light gray) and Tx (dark gray) mice ($n = 4$ for sTx and $n = 5$ for Tx, pooled data from 2 distinct experiments, ns, not significant, ** $P < .01$ by unpaired Student's *t* test).



(eBioscience) following the manufacturer's instructions. BrdU incorporation was analyzed using the BrdU flow kit from BD Biosciences following the manufacturer's instructions.

Before cell-surface staining, surface Fc receptors were saturated by incubation with acetic acid-purified antibody to CD16/CD32 (24G2) for 10 minutes on ice. The following antibodies were used: Alexa Fluor 488 anti-Ki67 (B56), Pacific blue anti-CD3e (500A2), PerCP and Pacific blue anti-CD4 (RM4-5), FITC and PerCP-Cy5.5 anti-CD69 (GL2F5), PE anti-NK1.1 (PK136), PerCP-Cy5.5 anti-CD19 (6D5), FITC anti-TCRβ (H57-597), PerCP-Cy5.5 anti-CD25 (PC61), PE anti-GM-CSF (MP1-22E); all purchased from BD Biosciences, and Pacific blue anti-IFN-γ (XMG1.2), PE-Cy7 anti-IL-4 (BVD6-24G2), PE anti-IL-17 (eBio 17B7), PE-Cy7 anti-CD44 (IM7), PerCP-Cy5.5 anti-NK1.1 (PK136), allophycocyanin-Alexa Fluor 750 anti-TCRβ (H57-597), PE anti-IL-13 (eBio13A), PerCP-eFluor710 anti-TNF-α (MP6-XT22), purchased from eBioscience. The empty and PBS57-labeled allophycocyanin- and PE-labeled mouse CD1d tetramers were obtained from the National Institutes of Health Tetramer Core Facility. The following antibodies were used for Nrp-1 expression analysis: polyclonal goat anti-rat Nrp-1 (AF566; R&D Systems); FITC, PE, and PE-Cy7 donkey anti-goat IgG (Santa Cruz Biotechnology); and Alexa Fluor 647 donkey anti-goat IgG (Invitrogen).

Data were acquired on a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences) using FACSDiva Version 6.1 software (BD Biosciences) and were analyzed with FlowJo Version 7.6 software (TreeStar).

INKT cell enrichment and cell sorting

When indicated, cell suspensions were enriched in INKT cells by depletion using antibodies directed against CD8α (53-6.7), CD62L (MEL-14), and CD19 (6D5), all purchased from BioLegend, and magnetic beads coupled to anti-rat IgG antibodies, purchased either from Invitrogen or from Ademtech, and following the manufacturer's instructions. For the enrichment of thymocyte suspensions, only anti-CD8α antibody was used for depletion.

For cell sorting, INKT cell-enriched spleen cell suspensions were stained with PE CD1d Tet, FITC anti-TCRβ, and anti-Nrp-1, followed by Alexa Fluor 647 anti-goat IgG. Cells were then sorted on a FACSAria II (BD Biosciences) cell sorter.

BrdU treatment

Mice were injected IP with 2 mg of BrdU (Sigma-Aldrich) in 200 μL of PBS and killed 1 hour later for the analysis of proliferating thymocytes.

Cell culture and in vitro activation of INKT cells

Total spleen cells (50×10^6 cells/mL) were labeled with 5 μM CFSE (Sigma-Aldrich) in PBS for 10 minutes at 37°C, and rinsed twice with cold PBS with 2% FCS. CFSE-labeled splenocytes (2×10^6 cells/mL) were then cultured for 3 days in 24-well plates in lymphocyte culture medium (RPMI 1640, 10% [vol/vol] FCS, 10 mM HEPES, 50 μM 2-ME, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL of penicillin, and 100 μg/mL of streptomycin). Recombinant human IL-7 and IL-15 (R&D Systems) were used at 20 ng/mL. α-GalCer (Alexis Biochemicals) was used at 100 ng/mL. FACS-sorted Nrp-1⁺ INKT cells (2×10^6) were activated by anti-CD3e (clone 145-2C11, generously provided by J. Diaz, Inserm U561, Paris, France) and anti-CD28 (clone 37.51; BioLegend) antibodies that had been previously coated at 5 μg/mL in 50 μL of PBS for 2 hours at 37°C.

For functional assays, sorted Nrp-1⁺ and Nrp-1⁺ INKT cells (2×10^6) were activated by irradiated (30 Gy) spleen cells (1×10^6) and 100 ng/mL of α-GalCer for 3 days. Total spleen cells (5×10^6) from sham-thymectomized and thymectomized animals were cultured in the presence of 100 ng/mL of α-GalCer for 48 hours. Culture supernatants were collected and stored at -80°C until analysis. To determine cell proliferation, [³H]-thymidine (1 μCi/well; Amersham) was added for the last 12 hours of culture and the cell-associated radioactivity was read by a microscintillation β counter (Wallac).

To quantify and phenotype cytokine-producing INKT cells *in vivo*, INKT-enriched cell suspensions (5×10^6) were cultured in lymphocyte culture medium supplemented with 10 mM phenol 12-myristate 13-acetate (PMA), 1 μM ionomycin, and 5 μg/mL of brefeldin A (all from Sigma-Aldrich) for 3 hours. Cells were then recovered and washed once in PBS plus 2% FCS before staining.

All cell cultures were at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

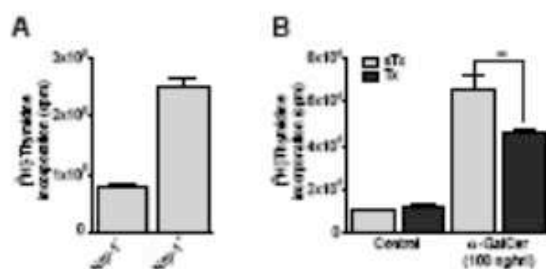


Figure 2. Nrp-1⁺ RTE INKT cells proliferate more than Nrp-1⁻ mature INKT cells after in vitro activation. (A) Proliferation of FACS-sorted splenic Nrp-1⁻ and Nrp-1⁺ INKT cells after 3 days of in vitro activation with irradiated spleen cells in lymphocyte culture medium alone (Control) or supplemented with α-GalCer. Representative data of 2 distinct experiments. (B) Proliferation of total splenic cells from sham-thymectomized (aTx, light gray) and thymectomized (Tx, dark gray) mice after 2 days of in vitro activation with α-GalCer ($n = 3$ for aTx and $n = 4$ for Tx, $^{**}P < .05$ by unpaired Student's *t* test).

Quantification of cytokine secretion

IFN-γ and IL-4 concentrations in culture supernatants were measured by flow cytometry using the CBA Mouse Th1/Th2 Cytokine Kit (BD Biosciences) or by ELISA (R&D Systems) following the manufacturer's instructions. IL-17 concentration was measured by ELISA (R&D Systems), as described previously.¹⁸

In vivo activation of INKT cells

For long-term activation of INKT cells, mice were injected IP with 2 μg of α-GalCer in 200 μL of PBS. For short-term activation of INKT cells and intracellular cytokine staining, mice were injected IP with 250 μg of brefeldin A in 200 μL of PBS (unless otherwise stated), followed 30 minutes later by IP injection of 2 μg of α-GalCer in 200 μL of PBS. Mice were killed after 2 hours for spleen cell recovery and analysis.

Intrathymic FITC injection

Five-week-old mice were deeply anesthetized by IP injection of a mixture of ketamine (10 mg/kg) and xylazine (1 mg/kg) in 200 μL of PBS. The shaved skin above the rib cage was cut open with fine scissors and the rib cage was opened with a 5-mm-long incision of the sternum to gain access to the thymus. Both thymic lobes were injected with 10 μL of a 2 mg/mL FITC (Sigma-Aldrich) solution in PBS. The wound was closed by sewing the 2 flaps of skin together with 2-3 suture points, and the animals were left to recover on their flanks in a heated cage. Control animals were left untreated.

Adult mouse thymectomy

Eight-week-old mice were deeply anesthetized and their rib cages opened as described in "Intrathymic FITC injection." The 2 thymic lobes were then carefully removed with an aspirator. The wound was closed and the animals were left to recover. Control (sham-thymectomized) animals were anesthetized and had their rib cages opened. After 4 weeks, the animals were killed for analysis. At that point, the completeness of thymectomy was checked and mice with thymic remnants were excluded from the study.

Statistical analyses

Data are expressed as means ± SEM and were compared using the statistical tests indicated in the figure legends using Prism 5.0 software (GraphPad). $P < .05$ was considered significant.

Results

Nrp-1 is expressed by immature INKT cells

In the thymus, Nrp-1 is not expressed in mature single-positive cells except for Foxp3⁺ Treg precursors.²⁷⁻²⁹ However, among

immature cortical double-negative (DN) and DP thymocytes, Nrp-1 is highly expressed on stages corresponding to the β-selection and pre-TCR-mediated expansion phases.²⁸ Accordingly, in short-pulse BrdU experiments, we found that blastic proliferating (FSC^{high} BrdU⁺) thymocytes all expressed high levels of Nrp-1 compared with smaller nonproliferating cells, which expressed low levels of Nrp-1 (supplemental Figure 1, available on the Blood Web site; see the Supplemental Materials link at the top of the online article). The INKT cell lineage diverges from conventional αβ T cells at the DP stage.^{3,10,31} During their positive selection, Vα14⁺ DP cells receive signals resulting from cognate TCR engagement and signaling lymphocytic activating molecule (Slamf)Slam homotypic interactions,³² which initiate a proliferation wave mainly affecting stage I and stage II INKT precursors²³ but not long-term resident stage III INKT cells.⁵ We found Nrp-1 to be highly expressed in stage I and stage II, but only dimly on stage III thymic INKT cells (Figure 1A). Therefore, in non-Treg thymocytes, Nrp-1 expression was restricted to immature proliferating cells including NK1.1⁺ INKT cells.

Because stage II INKT cells are the main subset of cells exported to the periphery,^{7,9} we analyzed Nrp-1 expression in INKT cells in the periphery. In the spleens of naive adult mice, a subset of INKT cells expressed Nrp-1 at levels similar to Treg cells (Figure 1B). Comparing Nrp-1⁻ and Nrp-1⁺ INKT cells, a higher percentage of splenic Nrp-1⁺ INKT cells expressed the proliferation-associated marker Ki67 (Figure 1C), suggesting that Nrp-1 expression also correlated with proliferation in peripheral INKT cells. Moreover, splenic Nrp-1⁺ INKT cells were mostly CD69⁻ and NK1.1⁻ (Figure 1D), an immature phenotype characteristic of thymic stage II INKT cells. We also detected a subset of Nrp-1⁺ INKT cells bearing the same immature phenotype (CD69⁻ NK1.1⁻) in other peripheral lymphoid organs of adult naive mice: the liver and pLNs. The relative abundance of Nrp-1⁺ INKT cells in 8-week-old naive mice was low in the liver (5%), intermediate in the spleen and thymus (10%-15%), and high in the pLNs (40%; Figure 1E). Therefore, in the peripheral lymphoid organs of naive mice, Nrp-1 expression characterizes a subset of INKT cells that display a phenotype very similar to thymic stage II INKT cells.

Peripheral Nrp-1⁺ INKT cells are RTE

The majority of RTE INKT cells in the spleen and liver bear the NK1.1⁺ phenotype.^{7,9} However, this also characterizes a distinct subset of INKT cells that remains unaffected by adult thymectomy.¹¹ Using in situ labeling of thymocytes with FITC, we showed that Nrp-1 was highly expressed on almost all RTE INKT cells in the spleen (Figure 2A-B). In contrast, Nrp-1 was not expressed in RTE conventional CD4⁺ and CD8⁺ T cells (supplemental Figure 2A), but marked RTE CD25^{high} Treg cells (supplemental Figure 2B), which is consistent with its expression pattern in conventional thymocytes. Therefore, high expression of Nrp-1 was a specific characteristic of RTE INKT cells. Given the percentage of randomly labeled thymocytes (30% on average) and the relative proportion of FITC⁺ cells in splenic Nrp-1⁺ INKT cells 36 hours after intrathymic FITC injection (10% in average), we calculated that 36-hour RTE INKT cells accounted for approximately one-third of the pool of Nrp-1⁺ INKT cells in the spleen.

To further understand the contribution of thymic export to the Nrp-1⁺ INKT cell subset in adult mice, we thymectomized

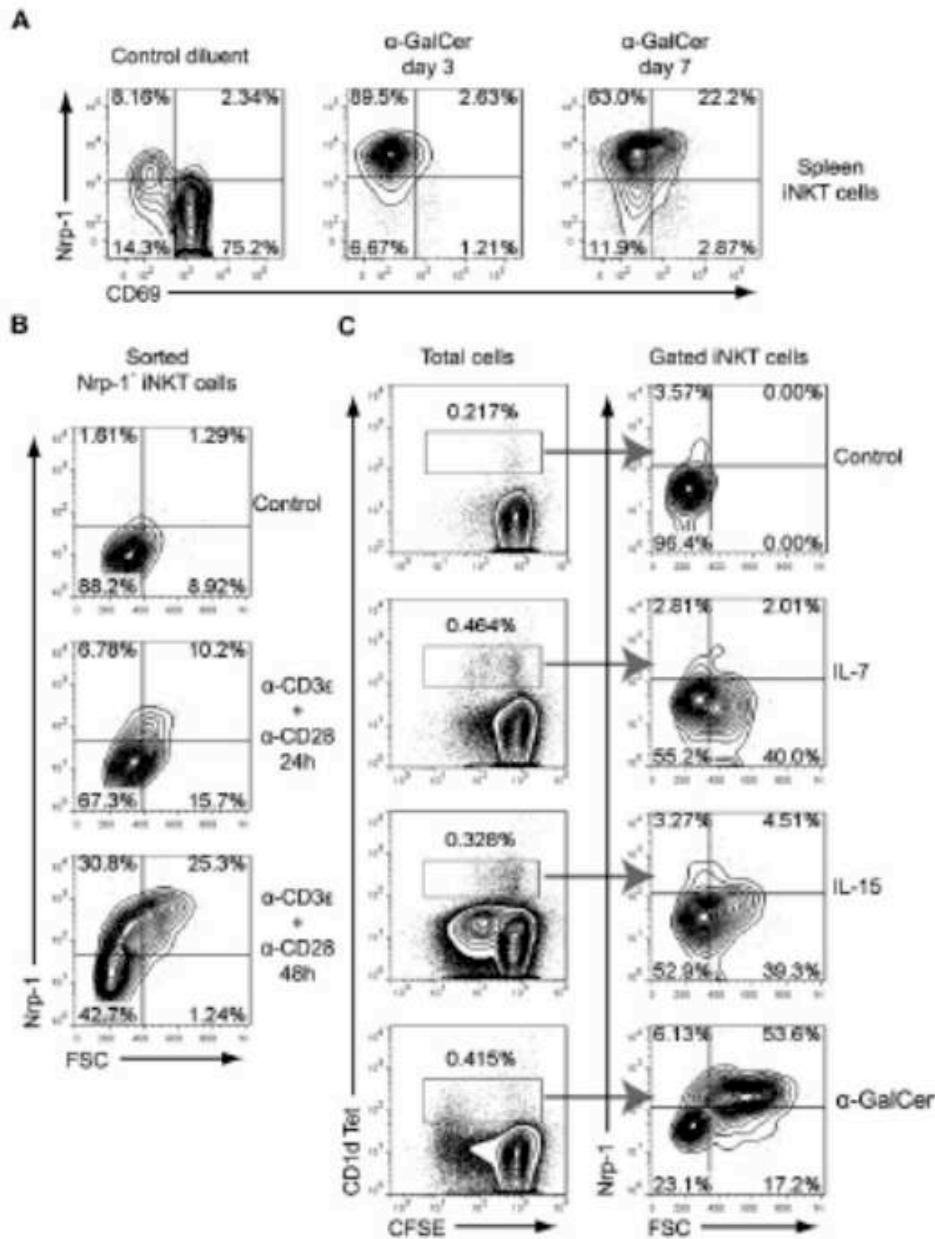


Figure 4. Nrp-1 expression is induced on INKT cells after TCR activation. (A) Mice were injected IP with α-GalCer or control diluent, and CD69 and Nrp-1 expression on gated TCRβ⁺ CD1d Tcr⁺ spleen INKT cells was analyzed after 3 and 7 days. Representative data of 1 mouse of 2 per time point in 1 of 2 experiments are shown. (B) FACS-sorted spleen Nrp-1⁺ INKT cells were cultured in lymphocyte culture medium alone (Control) or activated with anti-CD3ε and anti-CD28, and Nrp-1 expression on activated INKT cells was analyzed by FACS at 24 and 48 hours. Representative data of 1 of 2 experiments are shown. (C) Analysis of Nrp-1 expression on CD1d Tcr⁺ cells after *in vitro* culture of CFSE-labeled spleen cells in lymphocyte culture medium alone (Control) or supplemented with IL-7, IL-15, or α-GalCer for 72 hours. These data are representative of 2 distinct experiments performed in duplicate wells.

(or sham-thymectomized as a control) 8-week-old mice. Four weeks after thymectomy, although the relative percentage of INKT cells among spleen cell lymphocytes was unchanged, we observed a close to complete disappearance of the immature CD69⁺Nrp-1⁺ INKT cell subset from the spleens of thymectomized animals (Figure 2C). Because the total number of spleen cells was left unchanged by thymectomy, this was reflected by a

dramatic and specific decrease in splenic Nrp-1⁺ but not Nrp-1⁻ INKT total cell numbers after thymectomy (Figure 2D). At adult age, continuous thymic output thus entirely contributed to the Nrp-1⁺ INKT cell pool. These results revealed Nrp-1 to be a bona fide marker of RTE INKT cells in naive adult mice, and enabled us to use the Nrp-1 marker to study functional characteristics of RTE INKT cells.

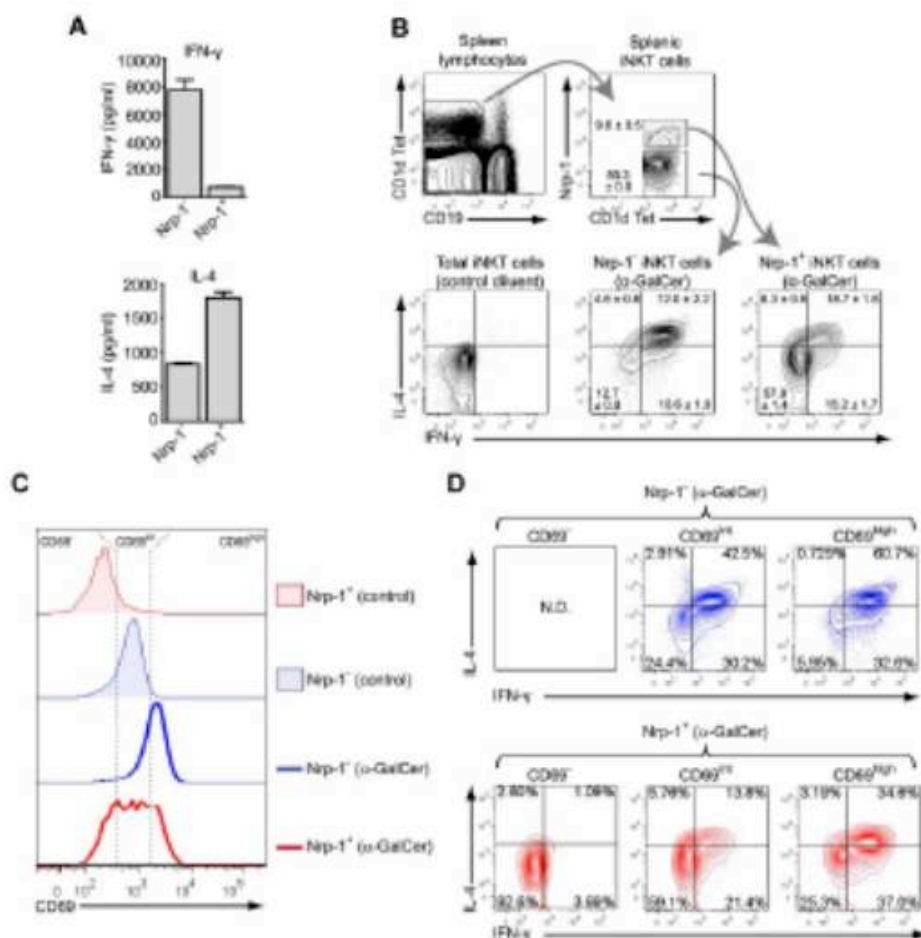


Figure 5. Nrp-1⁺ RTE INKT cells are biased toward IL-4 secretion after in vitro activation but contain few rapid IFN- γ and IL-4 producers. **(A)** IFN- γ (top) and IL-4 (bottom) concentrations in culture supernatants of FACS-sorted splenic Nrp-1⁻ and Nrp-1⁺ INKT cells after 2 days of in vitro activation with irradiated spleen cells and α -GalCer. **(B)** Representative analysis of IFN- γ and IL-4 production in gated splenic Nrp-1⁻ and Nrp-1⁺ INKT cells 2 hours after IP injection of α -GalCer in 6-week-old mice. The mean \pm SEM percentage of cells in defined gates or quadrants is indicated in FACS dot plots ($n = 4$, pooled data from 2 distinct experiments). **(C-D)** Mice were injected IP with 2 μ g of α -GalCer or control diluent without prior injection of brefeldin A and killed 2 hours later for analysis. **(C)** CD69 expression in splenic Nrp-1⁻ (blue) and Nrp-1⁺ (red) TCR β ⁺ CD1d Tet⁺ INKT cells from control (shaded) and basted (bold line) animals. These levels of CD69 expression [CD69^{int}, CD69^{int}, and CD69^{int}] were determined, as indicated by the dotted lines. **(D)** Intracellular staining for IFN- γ and IL-4 in Nrp-1⁻ (blue) and Nrp-1⁺ (red) INKT cell subsets separated according to CD69 expression levels. These data are representative of 3 distinct experiments. ND indicates not detected.

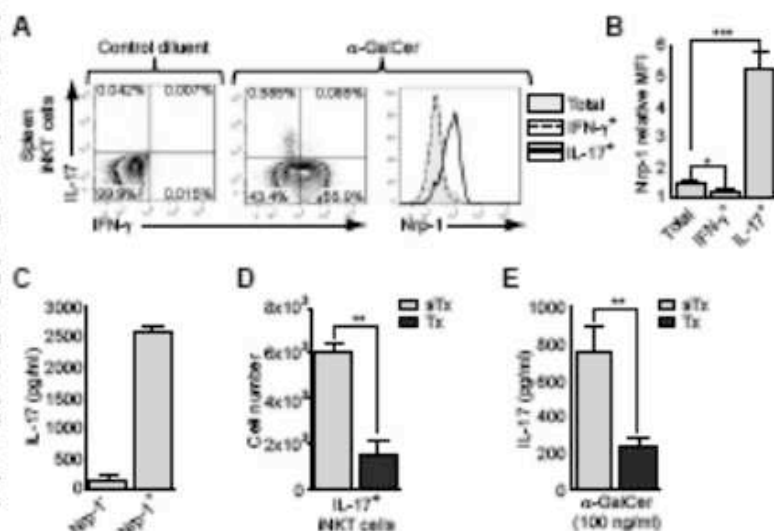
RTE proliferate more than mature INKT cells in vitro

The response of INKT cells to antigen stimulation is characterized by strong proliferation that is maximal 2–3 days after initial challenge.³⁴ Three days after in vitro activation with α -GalCer, sorted splenic Nrp-1⁺ INKT cells proliferated 3 times more than Nrp-1⁻ INKT cells (Figure 3A). To further analyze the contribution of RTE INKT cells to the proliferative response of peripheral INKT cells after antigen stimulation, we assessed the proliferation of total spleen cells from sham-thymectomized (sTx) and thymectomized (Tx) adult mice after a 2-day culture with α -GalCer. Spleen cells from Tx mice displayed significantly reduced proliferation in this assay (Figure 3B). Therefore, RTE INKT cells have enhanced proliferative capacity after antigen stimulation and actively participate in the expansion of peripheral INKT cells after in vitro α -GalCer challenge.

Nrp-1 is induced on proliferating INKT cells after TCR activation

In vivo challenge with α -GalCer resulted in the majority of expanded splenic INKT cells expressing Nrp-1 in combination with low CD69 expression at days 3 and 7 after IP injection (Figure 4A). This could have resulted from the superior proliferative response observed for Nrp-1⁺ INKT cells in vitro and from de novo expression of Nrp-1 on mature INKT cells after antigen stimulation. To address the latter hypothesis, we analyzed Nrp-1 expression after in vitro TCR activation of sorted mature splenic Nrp-1⁻ INKT cells. In this assay, Nrp-1 expression was induced on activated INKT cells in a time-dependent manner (Figure 4B). Engagement of the TCR seemed to be required for the induction of Nrp-1 expression in proliferating mature INKT cells in vitro because the cytokines

Figure 6. Splenic IL-17-producing INKT cells are Nrp-1⁺ RTE INKT cells. (A) Mice were treated as in Figure 5B and INKT-enriched spleen cell suspensions were prepared for FACS analysis of IFN- γ and IL-17 production in INKT cells. (A) Representative dot-plot analyses of IFN- γ and IL-17 expression in splenic INKT cells of mice treated either with control diluent (left) or α -GalCer (middle), and histogram overlay showing Nrp-1 expression in total (shaded gray), IFN- γ ⁺ (dotted line), and IL-17⁺ (thick black line) INKT cells. (B) Nrp-1 relative MFI of total, IFN- γ ⁺, and IL-17⁺ INKT cells ($n = 4$, pooled data from 2 distinct experiments, * $P < .05$, *** $P < .001$ by unpaired Student's t test). (C) IL-17 concentration in culture supernatants of FACS-sorted splenic Nrp-1⁺ and Nrp-1⁻ INKT cells after 3 days of *in vitro* activation with irradiated spleen cells and α -GalCer. (D) Absolute numbers of IL-17⁺ splenic INKT cells in sham-thymectomized (sTx, light gray) and thymectomized (Tx, dark gray) mice assessed by FACS analysis after *in vitro* activation of INKT-enriched cell suspensions with PMA and ionomycin ($n = 3$ for sTx and $n = 4$ for Tx, ** $P < .01$ by unpaired Student's t test). (E) IL-17 concentration in culture supernatant of total spleen cells from sham-thymectomized (sTx, light gray) and thymectomized (Tx, dark gray) mice after 2 days of *in vitro* activation with α -GalCer ($n = 3$ for sTx and $n = 4$ for Tx, ** $P < .01$ by unpaired Student's t test).



IL-7 and IL-15 induced INKT-cell proliferation (as described previously³³) without Nrp-1 expression, whereas α -GalCer induced high expression of Nrp-1 in proliferating blastic INKT cells (Figure 4C). Therefore, peripheral accumulation of Nrp-1⁺ INKT cells after antigen stimulation *in vivo* may result from superior expansion of Nrp-1⁺ RTE INKT cells and TCR-induced Nrp-1 expression in expanding INKT cells.

Nrp-1⁺ RTE INKT cells are biased toward IL-4 secretion after *in vitro* activation but contain few rapid IFN- γ and IL-4 producers *in vivo*

The innate effector properties of INKT cells notably rely on their ability to rapidly and massively produce both IFN- γ and IL-4 after antigen encounter. First we analyzed IFN- γ and IL-4 production by *in vitro*-activated splenic Nrp-1⁻ and Nrp-1⁺ INKT cells. Whereas mature Nrp-1⁻ INKT cells produced high amounts of both IFN- γ and IL-4, Nrp-1⁺ RTE INKT cells produced 10 times less IFN- γ and twice as much IL-4, thus exhibiting a marked bias toward IL-4 production *in vitro* (Figure 5A). When we analyzed the *in vivo* production of these cytokines by intracellular staining 2 hours after IP α -GalCer injection, we found that most mature splenic Nrp-1⁻ INKT cells produced both IFN- γ and IL-4, but Nrp-1⁺ RTE INKT cells were mostly negative for any of the 2 cytokines analyzed (Figure 5B). In particular, only 25%–30% of Nrp-1⁺ INKT cells were positive for IL-4 in combination or not with IFN- γ . In an *in vitro* time-course experiment, Nrp-1⁻ INKT cell numbers continuously decreased in the first 72 hours and IL-4 secretion reached its maximum between 24 and 48 hours after activation, whereas Nrp-1⁺ INKT cells started proliferating extensively after 24 hours and continuously secreted IL-4 (supplemental Figure 3). These results suggested that, in contrast to the rapid, proliferation-independent IL-4 production observed for mature Nrp-1⁻ INKT cells, the abundant IL-4 secretion by Nrp-1⁺ INKT cells in response to antigen stimulation was slower and required cell proliferation.

Consistent with the poor capacity of Nrp-1⁺ INKT cells to rapidly produce IFN- γ and IL-4, adult thymectomized mice had as

many splenic IFN- γ ⁺ and IL-4⁺ INKT cells as control mice after *in vitro* short-term activation with PMA and ionomycin (supplemental Figure 4).

Another hallmark of INKT cell activation after *in vivo* antigen stimulation is the rapid up-regulation of surface CD69. Nrp-1⁺ INKT cells, which were mostly CD69⁻ in control animals, readily up-regulated CD69 2 hours after α -GalCer injection, although to a lesser extent than Nrp-1⁻ INKT cells (Figure 5C). CD69 up-regulation was positively correlated with increased percentages of IFN- γ ⁺ and/or IL-4⁺ cells in both Nrp-1⁻ and Nrp-1⁺ subsets (Figure 5D). In particular, those Nrp-1⁺ INKT cells that did not up-regulate CD69 after α -GalCer treatment failed to produce IFN- γ and IL-4 (Figure 5D), whereas CD69^{hi} and CD69^{lo} subsets displayed nonnegligible percentages of IL-4⁺ and IFN- γ ⁺ cells, showing that impaired rapid production of IFN- γ and IL-4 by Nrp-1⁺ INKT cells after *in vivo* antigen challenge was at least partly due to a delay in activation.

IL-17-producing INKT cells are RTE

Within activated Nrp-1⁺ INKT cells with high expression levels of CD69 (ie, similar to activated mature Nrp-1⁻ INKT cells), a relatively high percentage of cells were negative for either IFN- γ or IL-4 expression (Figure 5D), suggesting that these cells could be producing other cytokines. In a similar *in vivo* assay, we analyzed known INKT cell-produced cytokines in IFN- γ ⁺IL-4⁺ (DN) and non-DN subsets within Nrp-1⁻ and Nrp-1⁺ INKT cells (supplemental Figure 5A). We detected IL-13- and TNF- α -producing cells in DN and non-DN cells of both populations, whereas GM-CSF production was restricted to non-DN cells in both populations (supplemental Figure 5B-D). Strikingly, the pro-inflammatory cytokine IL-17 was detected almost exclusively in the Nrp-1⁺ population, principally in DN cells (supplemental Figure 5E). IL-17-producing INKT cells have been extensively described in the peripheral lymphoid organs and tissues of young adult mice,^{12–15,18,36,37} but whether these cells belong to RTE or to mature INKT cells remains unknown. In contrast to IFN- γ -producing INKT cells that were mostly Nrp-1⁻, IL-17-producing splenic INKT cells expressed Nrp-1 (Figure 6A-B).

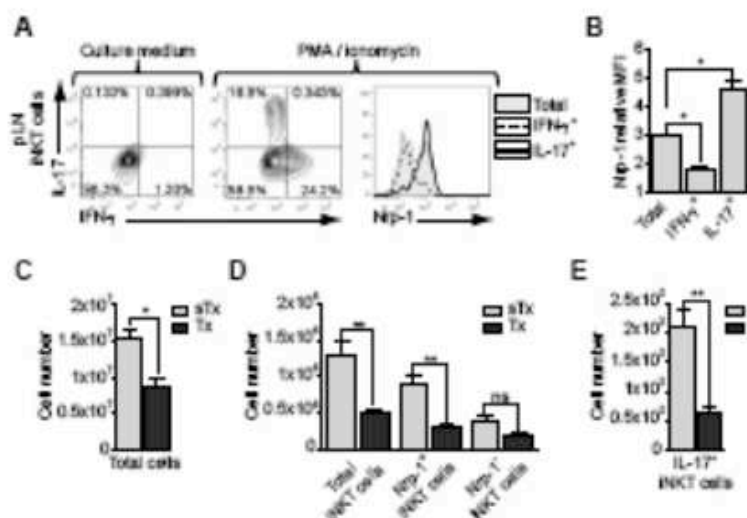


Figure 7. IL-17-producing INKT cells in pLNs are Nrp-1⁺ RTE INKT cells. (A–B) Eight-week-old mice INKT-enriched pLN cell suspensions were activated with PMA and ionomycin in the presence of brefeldin A and prepared for FACS analysis of IFN- γ and IL-17 production in INKT cells. (A) Representative dot-plot analyses of IFN- γ and IL-17 expression in resting (left) and activated (middle) pLN INKT cells, and histogram overlay (right) showing Nrp-1 expression in total (shaded gray), IFN- γ ⁺ (dotted line), and IL-17⁺ (thick black line) pLN INKT cells. (B) Nrp-1 relative MFI of total, IFN- γ ⁺, and IL-17⁺ pLN INKT cells (pooled data from 3 distinct experiments, * $P < .05$ by unpaired Student *t* test). (C–E) Absolute numbers of pLN total cells (C), total, Nrp-1⁺, and Nrp-1⁻ INKT cells (D), and IL-17⁺ INKT cells (E) in sham-thymectomized (sTx, light gray) and thymectomized (Tx, dark gray) mice ($n = 3$ for sTx and $n = 4$ for Tx; ns indicates not significant, * $P < .05$, ** $P < .01$ by unpaired Student *t* test).

Also consistent with our previous observations, only a small proportion of IL-17-producing INKT cells coproduced IL-4 (supplemental Figure 6A–B). However, IL-17 production was not exclusive, because almost 60% of IL-17⁺ INKT cells were also positive for TNF- α (supplemental Figure 6C–D). After *in vitro* activation with α -GalCer, sorted splenic Nrp-1⁺ INKT cells produced high amounts of IL-17 in the supernatant, whereas production by Nrp-1⁻ INKT cells was close to null (Figure 6C). Therefore, in naive adult mice, splenic IL-17-producing INKT cells expressed the RTE marker Nrp-1. Accordingly, the spleens of adult thymectomized mice contained 4 times fewer IL-17-producing INKT cells than control mice (Figure 6D). This numerical defect was accompanied by a sharp reduction in IL-17 concentration in the supernatant of α -GalCer-stimulated spleen cells from thymectomized mice compared with control animals (Figure 6E), thereby confirming that most splenic IL-17-producing INKT cells were RTE.

In skin-draining pLNs, INKT cells are found in small numbers but are highly enriched in NK1.1⁺ IL-17 producers^{15,36} as well as in Nrp-1⁺ INKT cells (Figure 1E). Similar to what was observed in the spleen, IL-17-producing INKT cells in pLNs expressed high levels of Nrp-1, whereas IFN- γ -producing cells were mostly Nrp-1⁻ (Figure 7A–B). Because pLNs are mostly populated by naive T cells that are continuously exported from the thymus, adult thymectomy reduced the numbers of total cells in pLNs by approximately 2-fold (Figure 7C). As expected, this reduction affected exclusively naive CD44^{hi} but not memory phenotype CD44^{lo} conventional T cells (data not shown). After adult thymectomy, the numbers of total, Nrp-1⁺, and Nrp-1⁻ INKT cells were reduced 2.5-, 2.9-, and 2-fold, respectively (Figure 7D), reflecting a selective impact of thymus removal on Nrp-1⁺ INKT cell numbers in pLNs. Moreover, intracellular staining after *ex vivo* activation of INKT-enriched pLN cell suspensions revealed a 3.2-fold reduction in IL-17-producing INKT cell numbers in thymectomized mice (Figure 7E). Our experiments involving splenic and pLN-homing INKT cells revealed that the majority of IL-17-producing INKT cells in naive adult mice were part of the RTE subset rather than the long-lived NK1.1⁺ subset.

Discussion

In the present study, we have shown that Nrp-1 expression defines a subset of immature INKT cells in the thymus and peripheral lymphoid organs of naive mice. In immature thymocytes and thymic INKT cells, Nrp-1 expression was correlated with proliferation. Furthermore, TCR-induced, but not IL-7- or IL-15-induced, proliferation of peripheral INKT cells was associated with Nrp-1 *de novo* expression. We and others have reported Nrp-1 expression on activated human T cells^{24,38} and immature proliferating murine thymocytes.^{18,39} Therefore, Nrp-1 might be a general marker of TCR- and pre-TCR activation, and its presence on RTE INKT cells, but not on naive and RTE conventional T cells, is likely because of the unconventional selection and development processes of INKT cells, which require TCR-triggered proliferative expansion shortly before egress. Previous studies have shown that RTE INKT cells share the thymic stage II phenotype (CD44^{hi}NK1.1⁺).^{7,10} Moreover, the very early activation marker CD69 has been described as an age-related maturation marker of splenic INKT cells⁴⁰ and was therefore postulated to be absent on RTE INKT cells. Our results unequivocally reveal Nrp-1 as an accurate specific marker of RTE INKT cells and show that the characteristic phenotype of these cells is indeed Nrp-1⁺NK1.1⁺CD69⁻. Furthermore, because Nrp-1 is expressed on ~30% of splenic NK1.1⁺ INKT cells (data not shown), we can gather that RTE account for approximately one-third of total NK1.1⁺ INKT cells in the spleen, the remaining two-thirds being long-lived mature cells. This is in agreement with the study by McNab *et al*, which showed that adult thymectomy caused a 25%–50% reduction in splenic NK1.1⁺ INKT cell proportions.¹¹

Based on the differential expression of Nrp-1 on RTE INKT cells, we have been able to analyze for the first time the response of RTE INKT cells to antigen stimulation both *in vitro* and *in vivo*. We have shown that RTE INKT cells respond to antigen stimulation *in vitro* by proliferating vigorously and secreting high amounts of IL-4 and very low amounts of IFN- γ . The rapid effector functions of INKT cells rely on the presence of high levels of IL-4 and IFN- γ mRNAs in resting mature INKT cells.^{41,42} Thymic stage II INKT

cells possess abundant mRNA for IL-4 but not for IFN- γ ,⁴¹ which is likely the reason for their strong bias for IL-4 production *in vitro*.^{7,15} Our *in vitro* data suggest that RTE INKT cells, which retain this bias, might also possess mRNA for IL-4 but not IFN- γ in the resting state. Therefore, the poor capacity of RTE INKT cells to rapidly produce IFN- γ and IL-4 after *in vivo* antigen challenge may not be because of the absence of cytokine mRNA in these cells. The *in vitro* time-course experiment and the incomplete up-regulation of CD69 *in vivo* suggest that the response of RTE INKT cells to TCR triggering may be delayed compared with mature INKT cells. Strong antigen stimulation of INKT cells is known to induce anergy dependent on the long-lasting expression of programmed death 1 on primed INKT cells.^{42,43} Signals involved in the positive selection of INKT cells may trigger the same anergy program in expanding thymic stage II and then RTE INKT cells. In support of this hypothesis, we found higher levels of programmed death 1 expression on Nrp-1⁺ RTE INKT cells from naive mice (data not shown), which could account for the relative anergy of RTE INKT cells in response to antigen stimulation *in vivo*.

Interestingly, many RTE INKT cells that expressed high levels of CD69 after *in vivo* activation still did not produce IFN- γ or IL-4, which suggests that some RTE INKT cells may exclusively produce nonclassical cytokines after stimulation. Our results show that IL-13 and TNF- α can be produced by RTE INKT cells independently of IFN- γ and IL-4 shortly after α -GalCer stimulation. Furthermore, we have shown that Nrp-1⁺ RTE INKT cells are potent and almost exclusive producers of the pro-inflammatory cytokine IL-17 *in vivo* and *in vitro*. Because we used brefeldin A, which inhibits protein trafficking to the cell membrane, to detect IL-17-producing cells, we have not been able to match IL-17 production to high CD69 up-regulation in activated Nrp-1⁺ RTE INKT cells. However, most INKT cells that produced IL-17 after stimulation did not simultaneously produce IFN- γ or IL-4, as described previously.³⁶ Together with the phenotypic observation that IL-17-producing INKT cells express the RTE marker Nrp-1, our analyses of adult thymectomized mice clearly showed that continuous thymic output is required to maintain the pool of IL-17-producing INKT cells in lymphoid organs. Three nonmutually exclusive hypotheses might explain this unexpected observation: (1) IL-17-producing INKT cells are only transiently present in lymphoid organs after their egress from the thymus and preferentially home to nonlymphoid tissues, (2) the capacity to produce IL-17 is only transitory and is lost upon maturation, and/or (3) most IL-17-producing INKT cells are short-lived in lymphoid organs. In support of the first hypothesis, IL-17-producing INKT cells have been shown to express tissue homing receptors such as CCR6 and CD103³⁶ and have been found in tissues such as the lungs^{16,17} and the skin.²⁶ Moreover, we have previously shown that IL-17-producing INKT cells represent a distinct and definitive lineage of INKT cells that expresses the transcription factor ROR- γ T and cannot give rise to IL-4 and IFN- γ producers upon transfer into fetal thymic organ cultures.¹⁸ Although this observation seems to rule out the second hypothesis, not all ROR- γ T⁺ INKT cells produce IL-17 after stimulation,^{18,36} so IL-17 production capacity could be limited to the most recently exported ROR- γ T⁺ INKT cells also expressing the RTE marker Nrp-1. Finally, whereas long-term survival and homeostatic renewal of mature INKT cells in lymphoid organs is crucially dependent on IL-15,²⁵ neither IL-17-producing INKT cells³⁶ nor RTE INKT cells express the IL-15 receptor subunit CD122 (data not shown). The survival of IL-17-producing INKT cells might depend on one or several

cytokines that are not as abundant as IL-15 in the lymphoid organs of naive mice, which would result in a short half-life of these cells in the spleen and pLNs.

Our study also raises the question of Nrp-1 function in immature thymic and RTE INKT cells. Nrp-1 has been shown to bind and enhance the intracellular signaling of TGF- β 1,^{24,45} a cytokine crucially involved in INKT-cell development and maturation.^{46–48} Nrp-1 expression might increase the effects of TGF- β 1 in thymic immature INKT cells and thus positively regulate their development. Increased sensitivity of Nrp-1⁺ INKT cells to TGF- β 1 might also regulate the acquisition of specific tissue-homing receptors (eg, CD103) on IL-17-producing INKT cells, as suggested by Doisne et al.³⁶ or it may facilitate their survival in nonlymphoid tissues. Moreover, Nrp-1 mediates long-term interactions between Treg cells and immature dendritic cells through Nrp-1/Nrp-1 *trans* interactions.²³ A recent *in vivo* imaging study revealed the importance of cognate stable interactions between INKT cells and macrophages for the initiation of immune responses to glycolipids in the lymph nodes.⁴⁹ Nrp-1, which is highly expressed by lymph node-resident INKT cells and may be expressed by macrophages,⁵⁰ might play a pro-adhesive role in this context.

In conclusion, based on the characteristic Nrp-1 marker, we have identified important functional features of RTE INKT cells. Remarkably, pro-inflammatory IL-17-producing INKT cells in lymphoid organs are continuously renewed by thymic output in adult mice. These data therefore reveal the crucial role of thymic function in innate IL-17-mediated immune responses and provide the basis for a thorough analysis of the role of RTE INKT cells in animal models of inflammation, infection, and autoimmunity. Our results also reveal the need for a more detailed understanding of Nrp-1 function in non-Treg T cells.

Acknowledgments

The authors thank A. Lehen for sharing unpublished data and for helpful discussions; A. Napolitano and P. Dellabona for sharing unpublished data and helpful information; J. Mègez and C. Garcia for cell sorting; M. McHeyzer-Williams for critically reviewing the manuscript; and the National Institutes of Health Tetramer Core Facility (Bethesda, MD) for providing CD1d tetramer reagents.

This work was supported in part by grants from Institut National du Cancer, Cancéropole Ile de France, Fondation de France, and Association pour la Recherche sur le Cancer, and by fellowships from Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur, Association pour la Recherche sur le Cancer (to P.M.), and La Ligue contre le Cancer (to A.R.).

Authorship

Contribution: P.M. designed, performed, and analyzed the experiments, interpreted the data, and wrote the manuscript; A.R., B.M., and S.D. performed and analyzed the experiments; A.H. and M.L.A.M. designed the experiments, interpreted the data, and edited the manuscript; and M.-T.R. and O.H. designed the experiments, interpreted the data, edited the manuscript, and supervised the study.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Olivier Hermine, CNRS UMR 8147, Hôpital Necker-Enfants Malades, Bâtiment Sèvres Porte S2 5^{ème} étage, 149 rue de Sèvres, 75743 Paris Cedex 15, France; e-mail: ohermine@gmail.com.

References

- Cerandolo V, Sfikis JD, Meiri SH, Sella M. Homeostatic invariant NKT cells in vaccination strategies. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(1):29-38.
- Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van Kaer L. NKT cells: what's in a name? *Nat Rev Immunol*. 2004;4(3):231-237.
- Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:297-336.
- Bendelac A. Positive selection of mouse NK1+ T cells by CD1-expressing cortical thymocytes. *J Exp Med*. 1995;182(5):2091-2095.
- Gapin L, Matsuda JL, Sath CD, Kronenberg M. NKT cells derive from double-positive thymocytes that are positively selected by CD1d. *Nat Immunol*. 2001;2(10):71-77.
- Wei DG, Lee H, Park SH, et al. Expansion and long-range differentiation of the NKT cell lineage in mice expressing CD1d exclusively on cortical thymocytes. *J Exp Med*. 2005;202(2):239-248.
- Berzins K, Nyn T, Beavis A, Teyton L, Bendelac A. A thymic precursor to the NK T cell lineage. *Science*. 2002;295(5557):553-555.
- Berzins SP, McNab FW, Jones CM, Smyth MJ, Godfrey DI. Long-term retention of mature NK1.1+ NKT cells in the thymus. *J Immunol*. 2006;176(7):4054-4059.
- Pellucot DG, Hammond KJ, Uldrich AP, Baurer AG, Smyth MJ, Godfrey DI. A natural killer (NKT) cell developmental pathway involving a thymus-dependent NK1.1+CD4+/-CD1d-dependent precursor stage. *J Exp Med*. 2002;195(7):835-844.
- Godfrey DI, Stankovic S, Baurer AG. Raising the NKT cell family. *Nat Immunol*. 2010;11(3):197-206.
- McNab FW, Pellucot DG, Field K, et al. Peripheral NK1.1+ NKT cells are mature and functionally distinct from their thymic counterparts. *J Immunol*. 2007;178(10):6530-6537.
- Yoshida Y, Goto D, Sugawara S, et al. Invariant NKT cells produce IL-17 through IL-23-dependent and -independent pathways with potential modulation of Th17 responses in collagen-induced arthritis. *Int J Mol Med*. 2008;22(3):269-274.
- Rachakavala AV, Hansen AM, Horal R, et al. Cutting edge: NKT cells constitutively suppress IL-23 receptor and RORgamma and rapidly produce IL-17 upon receptor ligation in an IL-6-independent fashion. *J Immunol*. 2008;180(5):5167-5171.
- Lee KA, Kang MI, Lee YS, et al. A distinct subset of natural killer T cells produces IL-17, contributing to airway infiltration of neutrophils but not to airway hyperactivity. *Cell Immunol*. 2009;251(1):50-55.
- Coquet JM, Chalmers S, Hyppasvuori K, et al. Diverse cytokine production by NKT cell subsets and identification of an IL-17-producing CD4-NK1.1+ NKT cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(12):11287-11292.
- Michel ML, Keller AC, Papet C, et al. Identification of an IL-17-producing NK1.1(hg) (NKT) cell population involved in airway eosinophilia. *J Exp Med*. 2007;204(5):665-670.
- Cua DU, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(7):476-489.
- Michel ML, Mendez-de-Cruz D, Keller AC, et al. Critical role of ROR-gamma1 in a new thymic pathway leading to IL-17-producing invariant NKT cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(50):16645-16650.
- Kolodkin AL, Livingston DN, Rowe EG, Tai YT, Giger RJ, Ginty DD. Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell*. 1997;90(4):759-769.
- Ho Z, Tessier-Lavigne M. Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell*. 1997;90(4):759-769.
- Scher S, Takahashi S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*. 1996;82(5):735-745.
- Pellet-Mary C, Franklin R, Jia H, Zachary I. Neuropilin: structure, function and role in disease. *Biochem J*. 2009;411(2):211-225.
- Zachary IC, Franklin R, Evans M, Pellet-Mary C. The role of neuropilins in cell signaling. *Biochem Soc Trans*. 2009;37(pt 6):1171-1179.
- Brader D, Probst-Keppler M, Westendorf AM, et al. Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur J Immunol*. 2004;34(2):623-630.
- Santa M, Andersen KG, Rando F, Mayr L, Betz AG. Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition. *Immunity*. 2009;29(4):402-412.
- Glinia Y, Prud'homme GJ. Neuropilin-1 is a receptor for transforming growth factor beta-1, activates its latent form, and promotes regulatory T cell activity. *J Leukoc Biol*. 2008;84(1):500-510.
- Mendez-de-Cruz DA, Lepointier Y, Brignier AC, et al. Neuropilins, semaphorins, and their role in thymocyte development. *Ann NY Acad Sci*. 2009;1159:20-28.
- Corbel C, Lemauchand V, Thomas-Yves V, Pelus AS, Agbolos C, Romeo PH. Neuropilin 1 and CD25 co-regulation during early murine thymic differentiation. *Dev Comp Immunol*. 2007;31(11):1062-1074.
- Milpied P, Remond A, Brunet J, et al. Neuropilin-1 is not a marker of human Foxp3+ Treg. *Eur J Immunol*. 2009;39(5):1495-1497.
- Berzins JS, HBT, Stanic AK, Van Kaer L, Joyce S. Commitment toward the natural T (NKT) cell lineage occurs at the CD4+8+ stage of thymic ontogeny. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(14):5114-5119.
- Egawa T, Chant G, Tanuchi I, et al. Genetic evidence supporting selection of the Valpha4 NKT cell lineage from double-positive thymocyte precursors. *Immunity*. 2005;22(6):705-716.
- Griesbeck K, Bonowit C, Riedel S, et al. Homotypic interactions mediated by Slamf1 and Slamf6 receptors control NKT cell lineage development. *Immunity*. 2007;27(5):751-762.
- Cook M, Slackman BR, Hsu J, Bredemeyer AL, Bendelac A, Gausman R. Invariant thymic proliferation is essential for Valpha4+ natural killer T cell development depends on c-Myc. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(21):8641-8646.
- Wilson MT, Johansen C, Oliveira-Villagomez D, et al. The response of natural killer T cells to glycolipid antigens is characterized by surface receptor down-modulation and expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(19):10919-10924.
- Matsuda JL, Gapin L, Sidobre S, et al. Homocysteine of V alpha 14 NKT cells. *Nat Immunol*. 2002;3(10):955-974.
- Delane JA, Baccot C, Anniel L, et al. Skin and peripheral lymph node invariant NKT cells are mainly retinoic acid receptor-related orphan receptor (gamma)+ and respond preferentially under inflammatory conditions. *J Immunol*. 2002;169(2):2142-2148.
- Pichavant M, Goya S, Meyer EH, et al. Cocarcinogenesis in a mouse model induces airway hyperactivity that requires the presence of natural killer T cells and IL-17. *J Exp Med*. 2009;205(2):225-232.
- Catalano A. The neuroimmune semaphorin-3a reduces inflammation and progression of experimental autoimmune arthritis. *J Immunol*. 2010;185(10):6373-6382.
- Yamamoto T, Morita S, Go R, et al. Clonally expanding thymocytes having lineage capability in gamma-ray-induced mouse atrophic thymus. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2010;77(1):235-243.
- Kim PJ, Pal SY, Brigi M, Beana GS, Gumpert J, Ho JC. GATA-3 regulates the development and function of invariant NKT cells. *J Immunol*. 2009;177(10):6550-6559.
- Stetson CB, Mohr M, Reinhardt RL, et al. Constitutive cytokine mRNA in natural killer (NK) and NK T cells poised for rapid effector function. *J Exp Med*. 2002;195(7):1069-1076.
- Matsuda JL, Gapin L, Baron JL, et al. Mouse V alpha 14 natural killer T cells are resistant to cytokine polarization in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(14):5225-5230.
- Panik VV, Lakshmi S, Kim S, et al. PD-1/CD137 blockade prevents energy induction and enhances the anti-tumor activities of glycolipid-activated invariant NKT cells. *J Immunol*. 2009;182(5):2815-2825.
- Chang WS, Kim JY, Kim YJ, et al. Cutting edge: Programmed death-1 (programmed death ligand 1) interaction regulates the induction and maintenance of invariant NKT cell energy. *J Immunol*. 2002;169(10):6707-6710.
- Cao Y, Szabo EA, Datta SK, et al. Neuropilin-1 mediates divergent R-Smad signaling and the myeloblastic phenotype. *J Biol Chem*. 2010;285(41):31840-31848.
- Marie JC, Lippert D, Rudenski AY. Cellular mechanisms of fetal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor. *Immunity*. 2009;29(2):441-454.
- Li MO, Sanjabi S, Flavell RA. Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity*. 2006;25(3):455-471.
- Delane JA, Bartholin L, Van KR, et al. NKT cell development is orchestrated by different branches of TGF-beta signaling. *J Exp Med*. 2009;206(5):1265-1276.
- Barnal R, Polakis R, Bruchbauer A, et al. CD137+ macrophages present lipid antigens to mediate early activation of NKT cells in lymph nodes. *Nat Immunol*. 2010;11(4):302-312.
- Ji JD, Park-Min KH, Ivashkin LB. Expression and function of semaphorin 3A and its receptors in human monocyte-derived macrophages. *Hum Immunol*. 2006;70(4):211-217.

RESUME

Le thymus est un organe permettant le développement des lymphocytes T, partie intégrante du système immunitaire. Ces cellules sont communément associées au système immunitaire adaptatif, bien que certaines populations, dont les lymphocytes iNKT et $T\gamma\delta$, soient associées au système immunitaire inné. De manière générale, ces lymphocytes « innés » sont capables de répondre très rapidement à différents signaux d'activation, par la production rapide et massive d'IL-4, d'IFN- γ et d'IL-17. Notre laboratoire a mis en évidence l'existence de deux sous-populations de lymphocytes iNKT, iNKT conventionnels et iNKT17, ayant deux voies de différenciation thymique bien distinctes, mais dont les mécanismes de détermination sont encore inconnus. Il a été montré que « SLAM-associated protein » (SAP) est indispensable au développement des lymphocytes iNKT, puisqu'ils sont absents chez les souris déficientes en SAP. D'autre part, ces mêmes souris montrent également une déficience de la réponse Th2. Nous avons alors émis l'hypothèse que SAP pourrait être impliqué dans la production d'IL-4 par les lymphocytes iNKT, et dans la détermination des deux sous-populations de lymphocytes iNKT conventionnel ou producteur d'IL-17.

Dans une première partie, nous avons utilisé des souris triple mutantes $Sap^{-/-} V\alpha 14Tg-ROR(\gamma t)-Egfp$, permettant l'étude des sous-populations de lymphocytes iNKT malgré la déficience en SAP. Nous avons ainsi montré que SAP est indispensable à l'acquisition thymique de la capacité de production d'IL-4 par les lymphocytes iNKT conventionnels. Chez ces souris déficientes en SAP, nous avons observé une augmentation de la fréquence des lymphocytes iNKT17 $ROR\gamma t^{pos}$ producteurs d'IL-17, ce qui montre clairement que SAP n'est pas nécessaire pour l'acquisition des propriétés fonctionnelles des lymphocytes iNKT17. Nous avons ainsi mis en évidence une nouvelle fonction de SAP dans le développement thymique des cellules iNKT productrices d'IL-4. De plus, nos résultats montrent que SAP est un point de contrôle obligatoire déterminant l'orientation de la différenciation thymique des cellules iNKT vers les cellules iNKT17 ou vers les cellules iNKT conventionnelles.

En parallèle des lymphocytes iNKT17 présents dans le thymus, nous avons également analysé une autre population T particulière : des thymocytes $TCR\alpha\beta^{pos}CD4^{pos}$ matures et producteurs d'IL-17, les lymphocytes Th17 naturels. Nous avons mis en évidence que ces lymphocytes expriment le facteur de transcription ROR γt . Ces lymphocytes T $CD4^{pos}CD8^{neg}CD44^{hi}ROR\gamma t^{pos}$ sont capables de produire rapidement et massivement de l'IL-17, mais requièrent l'IL-23 pour co-produire l'IL-22. De plus, ils se distinguent des lymphocytes Th17 induits, ou conventionnels, par l'expression du facteur de transcription PLZF et par leur capacité à répondre très rapidement à des stimuli pro-inflammatoires, notamment l'IL-23 associé à l'IL-1 β et un agoniste TLR4.

Les résultats obtenus durant cette thèse ouvrent donc de nombreuses perspectives de recherches fondamentale et thérapeutique, domaine dans lequel l'IL-17 est devenu une cible privilégiée pour le traitement des maladies auto-immunes.